Untersuchungen zur Bestimmung der L/S-Ratio aus dem Fruchtwasser als pränatalem Parameter der fetalen Lungenreife

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelm Universität

zu Bonn

vorgelegt von

BEATRIX DOLFEN

aus Köln

Bonn 1980

Untersuchungen zur Bestimmung der L/S-Ratio aus dem Fruchtwasser als pränatalem Parameter der fetalen Lungenreife

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelm Universität

zu Bonn

vorgelegt von

BEATRIX DOLFEN

aus Köln

Bonn 1980

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. E.J. Plotz

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Egge

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Universitäts-Frauenklinik Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. E.J. Plotz

Abteilung: Labor für Klinische Chemie
Leiter: Dr. H. Schlebusch

Druck: aku-Fotodruck, Gleueler Str. 217,
5000 Köln 41, Tel. 0221/437257

M e i n e n E l t e r n

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. E.J. Plotz
für die Überlassung des Themas
und Herrn Dr. H. Schlebusch für seine
Unterstützung bei der Durchführung meiner
Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536524_0024

Inhalt

	Seite
1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
2. Der "Surfactant"	4
2.1. Gewinnung des "Surfactant"	4
2.2. Zusammensetzung des "Surfactant"	5
2.3. Synthese der Phospholipide	6
2.4. Lecithin und Lungenreife	7
2.5. Meßgrößen zur Bestimmung der Lungenreife	10
2.5.1. Messung der Oberflächenspannung	10
2.5.2. Bestimmung der Phospholipide	12
2.5.3. Bestimmung der L/S-Ratio	15
3. Die L/S-Ratio	17
3.1. Methode von Gluck	17
3.2. Übersicht über Modifikationen in den einzelnen Analysenschritten	17
3.2.1. Wahl des Untersuchungsmaterials	19
3.2.2. Zentrifugation des Fruchtwassers	20
3.2.3. Aufbewahrung	23
3.2.4. Isolierung der Lipide	24
3.2.5. Acetonpräzipitation	29
3.2.6. Probenauftrag	37
3.2.7. Entwicklung im Fließmittel	38
3.2.8. Verwendung von Standards	39
3.2.9. Färbung und Veraschung	40
3.2.10. Quantitative Auswertung	44
4. Eigene Untersuchungen	49
4.1. Standardarbeitstechnik	49
4.2. Versuche zur Sprühtechnik	52
4.3. Verwendung von Ammoniumsulfat $((NH_4)_2SO_4)$	54
4.4. Untersuchungen zur densitometrischen Auswertung	59

Seite

4.5. Einflüsse auf die Trenneigenschaften der Dünnschichtplatten 64
4.6. Versuche zur Extraktion der Phospholipide aus dem Fruchtwasser 67
4.7. Versuche zur Acetonpräzipitation 82
4.8. Acetonpräzipitation von ^{14}C-Lecithin und ^{14}C-Sphingomyelin 89
4.9. Versuche der Qualitätskontrolle 104

5. Diskussion 107

6. Zusammenfassung 120

Literaturverzeichnis 122

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Im Jahre 1929 zeigte der Tuberkulosearzt K. von Neergaard (178), daß bei der Lungenexpansion mit Luft nur etwa ein Drittel des Druckes zur Überwindung der Gewebespannung, dagegen zwei Drittel zur Überwindung der Oberflächenspannung benötigt werden. Er vermutete eine Substanz unbekannter Zusammensetzung, die die Oberflächenspannung zu senken vermag. Diese Ergebnisse wurden jedoch nicht weiter verfolgt; man stellte auch keinen Bezug zu Vestermarks (176) Beobachtungen von 1932 her, nach denen das menschliche Sputum große Mengen gesättigten Lecithins enthält. 1946 entdeckte Thannhauser (170) den hohen Gehalt an gesättigtem Lecithin im Lungengewebe, und zwar an 1,2-Dipalmityl-sn-glycero-3-phosphoryl-cholin. Es hat längere Zeit gedauert, bis die Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen v. Neergaards und Thannhausers erkannt wurden. Erst in den letzten 10 Jahren wurde schließlich das vor 50 Jahren aufgeworfene Problem der oberflächenaktiven Substanzen der Lunge intensiv mit den Methoden der Biochemie bearbeitet. Als Ergebnis dieser Bemühungen kann jetzt das Atemnotsyndrom des Neugeborenen weitgehend molekularbiologisch als Defizit an oberflächenaktiven Substanzen in den Alveolen gedeutet werden. Einige Autoren (22, 3, 23) äußerten die Vermutung, daß die fetale Lunge an der Bildung von Fruchtwasser beteiligt ist, und zwar durch Transsudation oder Ultrafiltration von Plasma im Lungengefäßbett. Klaus et al. (89), Kuss (94), Goerke (62) und andere zeigten, daß die Mitochondrien der Alveolarepithelien Quelle des Lungen-Surfactant sind. Daraus ließe sich folgern, daß das Fruchtwasser von Kindern, die ein RDS (respiratory distress syndrome) entwickeln und/oder an einem "Hyalinen-Membran-Syndrom" versterben, ein verändertes Muster von Phospholipiden aufweist (122). In der folgenden Zeit bemühte man sich um eine Intensivierung der präpartalen Diagnose und eine Vertiefung der Kenntnisse zur Prävention des "idiopathischen Atemnotsyndroms", deren Grundlagen mit den Vorstellungen über die Biosynthese oberflächenaktiver Substanzen in der Lunge kausal zusammenhängen.

Therapeutische Bedeutung erlangte die Entdeckung des Einflusses von Glukokortikoiden auf die Lecithin-Synthese. Die Steroide aktivieren über alveoläre Rezeptoren, die bereits in der 12. Schwangerschaftswoche angelegt werden, die Cholin-Transferase, ein Schlüsselenzym der Lecithin-Synthese (94, 173, 44, 165).

Maternales Cortisol bleibt jedoch ohne Wirkung auf den fetalen Reifungsprozeß, da es bei der Placentapassage zu Cortison oxidiert wird, das selbst nicht fähig ist, die Lecithin-Synthese zu steigern. Über die Bedeutung der endogenen Glukokortikoide für die Surfactant-Synthese besteht noch Unklarheit. Überzeugende Resultate jedoch erzielt die therapeutische Applikation von Glukokortikoiden, z.B. Betamethason, wie es in einer Studie von Liggins & Howins 1972 (101) beschrieben ist. Ebenso konnte man durch Thyroxin, Heroin, Brom-Hexin Metabolit VIII und Isoxsuprin die Lungenreifung beschleunigen (146, 185, 56).

In den letzten Jahren hat die medikamentöse Beeinflussung der fetalen Lungenreife zunehmend an Bedeutung gewonnen.
In jüngerer Zeit zeigte sich jedoch, daß die routinemäßige Prophylaxe eines RDS durch Steroidapplikation mit potentiellen Risiken verbunden ist (7, 38). Im Tierexperiment konnten als Folgen der Steroidgabe folgende Veränderungen festgestellt werden:

1. Wachstumsretardierung generell und in einzelnen Organen
2. Störungen der Myelinisation des ZNS mit entsprechenden neurologischen Störungen
3. Thymushypoplasie mit eventuell irreversibler Schädigung der immunologischen Abwehrmechanismen.

Für den Menschen ist dagegen nur ein erhöhtes Risiko der fetalen bzw. neonatalen Nebennierenrindensuppression mit u.U. deletären Folgen für den Feten bei Infektion nachgewiesen. (7, 38, 15, 34, 101, 74)

Aufgrund dieser Ergebnisse sind diagnostische Methoden, die eine eindeutige Indikationsstellung für die Steroidapplikation verlangen, von großem Interesse.

Das Risiko der Amniocentese zur Fruchtwassergewinnung muß jedoch gegenüber dem Risiko der unkontrollierten Steroidgabe (2x40 mg Urbason bzw. 2x12 mg Betamethason an zwei aufeinander folgenden Tagen) individuell abgewogen werden. (141)
Nach den grundlegenden methodischen Arbeiten von Gluck zur Bestimmung des Surfactant wurde eine außerordentlich große Zahl an Modifikationen der ursprünglichen Arbeitstechnik publiziert. Dies legt die Vermutung nahe, daß die von Gluck und anderen Autoren angegebenen Methoden nicht zu allgemein zufriedenstellenden Ergebnissen führten. Insbesondere fällt auf, daß grundlegende Untersuchungen zu Präzision und Richtigkeit der verschiedenen Modifikationen fast völlig fehlen und daß von den meisten Autoren eine genaue Begründung für ihre eigene Arbeitstechnik nicht gegeben wird.
Es ist Aufgabe der vorliegenden Arbeit, die wichtigsten Methoden zur Bestimmung des Surfactant kritisch zu vergleichen, wobei das Schwergewicht auf der Messung der L/S-Ratio liegt - und eine eigene Methode zu entwickeln, die mit den Kriterien der analytischen Chemie klar beschrieben werden kann.

2. Der "Surfactant"

2.1. Gewinnung des "Surfactant"

Während man früher den Surfactant aus Lungenödemflüssigkeit und zerkleinertem Lungengewebe ("lung minces") gewann, benutzt man heute weitgehend fraktioniertes Lungenhomogenat (87, 2) oder sog. "alveolar washes". Behutsames Auswaschen des Respirationstraktes mit physiologischer Kochsalzlösung kann selbst im lebenden Organismus gefahrlos durchgeführt werden und vermeidet zudem die Verunreinigung durch Zellbestandteile, die in Gewebezerkleinerungen und -homogenaten vorliegen. Als modernste Technik darf die Mikropunktion betrachtet werden. (93)

Die chemische Zusammensetzung des Surfactant ist von der Methode seiner Gewinnung abhängig. King (87) teilt die Ergebnisse in drei Gruppen ein:

Gruppe A: unfraktioniertes Lungengewebe und Flüssigkeit von Auswaschungen "lavage fluid"

Gruppe B: durch relativ einfache Techniken gewonnene Fraktionen (Zentrifugation in physiologischer Kochsalzlösung in ein oder zwei Schritten)

Gruppe C: durch verfeinerte Techniken gewonnene Fraktionen (Differential- und Dichtegradientenzentrifugation)

Der Gehalt an gesättigten Phosphatidylcholinen, deren größten Anteil das Dipalmitylphosphatidylcholin (DPPC) ausmacht, liegt in unfraktioniertem Lungengewebe beträchtlich niedriger als in der Auswaschungsflüssigkeit, was eine Anreicherung oberflächenaktiven Materials in der Flüssigkeit durch physiologische Prozesse vermuten läßt. In Gruppe B ist nur ein geringer Anstieg des Gehaltes an DPPC gegenüber der Auswaschflüssigkeit zu verzeichnen. Das Verfahren der Differential- und Dichtegradientenzentrifugation (Gruppe C) erhöht den Gehalt an Phospholipiden und DPPC erheblich. Verschiedene chemische und physikalische Studien legen die Vermutung nahe, daß eine Verarbeitung, die verschiedene Schritte der Differential- und Dichtegradientenzentrifugation einschließt, wohl die stärkste Annäherung in vitro an den wirklichen Surfactantgehalt in der Lunge darstellt.

2.2. Zusammensetzung des "Surfactant"

Den größten Lipidanteil des Surfactant macht DPPC zusammen mit kleinen Mengen anderer gesättigter Phosphatidylcholine (41 - 58 % w/w) aus. DPPC war die erste Substanz, bei der man experimentell eine Senkung der Oberflächenspannung feststellte. Gluck (59) fand in der Lunge überlebender menschlicher Frühgeborener in einem nicht unbedeutenden Prozentsatz Palmitylmyristylphosphatidylcholin, dessen Oberflächenaktivität bei 37° geringer ist als die von DPPC, wie im folgenden noch genauer ausgeführt wird.
Einfach ungesättigte Phosphatidylcholine stehen mit 11 - 29 % (w/w) an zweiter Stelle. Unter den noch verbleibenden Phospholipiden hat Phosphatidyläthanolamin einen Anteil von 5 - 10 % (w/w). Phosphatidylglycerin erreicht gelegentlich Werte bis zu 10 %. Seine Bedeutung als oberflächenaktive Verbindung wird in jüngster Zeit zunehmend diskutiert.(73, 67, 69, 70, 71)
Der Gehalt an Neutrallipiden beträgt 5 - 13 % (w/w). Ihre größte Fraktion ist das unveresterte Cholesterin. (87)

Weiterhin isolierte man bei der Aufarbeitung des Surfactant Proteine, die nicht mit den Serumproteinen identisch sind. Obwohl sie fast ausnahmslos mit oberflächenaktiven Substanzen auftreten, so konnte man ihnen doch bisher keine eindeutige Funktion zuordnen. Aufgrund verschiedener Untersuchungen, die einen parallelen Anstieg dieser Proteine und der oberflächenaktiven Phospholipide im Fruchtwasser zeigten, stellte man die Hypothese auf, daß sie die Adsorption des Lungen-Surfactant an die Luft-Hypophasen-Grenzschicht fördern, d.h. den extrazellulären Transport des Surfactant zur Luft-Hypophasen-Grenzschicht beschleunigen. Auf diese Weise würden sie dazu beitragen, daß eine ausreichende Menge an Surfactant den physiologischen Erfordernissen entsprechend an der Alveolenoberfläche bereitgestellt würde.

Während die Lipide und Proteine wesentliche Bestandteile des azellulären Alveolenbesatzes darstellen, sind Lipoproteine und Glykoproteine nur mit geringerer Sicherheit nachgewiesen worden. Von den Glykoproteinen ist wenig bekannt, ihre Herkunft aus den Alveolen ist fraglich, da mit starken Beimengun-

gen von Bronchialschleim-Glykoproteinen gerechnet werden muß. Es bleibt abzuwarten, wieweit sich die histochemisch und immunhistochemisch nachgewiesenen Glykoprotein-Strukturen der azellulären Schicht (= Hypophase) eindeutig von der Glykokalix der Pneumocyten unterscheidet. (85, 150) Bei den bisher gefundenen Lipoproteinen ist nicht auszuschließen, daß es sich dabei nur um ein Gemisch von Lipiden und Proteinen handelt. (87, 94, 32)

2.3. Synthese der Phospholipide

Nach den heutigen Vorstellungen besteht ein Alveolus aus einschichtig angeordneten Epithelzellen vom Typ I und II mit einem azellulären Besatz der Zellmembran. Die azelluläre Schicht wird auch als Hypophase bezeichnet und damit begrifflich von den Grenzschichten, der "Luft-Hypophasen-Grenzschicht" und der "Hypophasen-Zellmembran-Grenzschicht" getrennt (32). Die Hypophase stellt den eigentlichen Surfactant dar. Elektronenoptisch sind in ihr Strukturen zu erkennen, die als "tubuläres Myelin" bezeichnet werden und als Äquivalente von Lipidmicellen gelten. (53) An der Luft-Hypophasen-Grenzschicht findet man eine osmiophile Lipidschicht (52). Es gibt starke Hinweise dafür, daß die lamellären Einschlußkörper der Pneumocyten vom Typ II mit der Synthese der Myelinstrukturen der Hypophase und diese wiederum mit der osmiophilen Lipidschicht der "Luft-Hypophase-Grenzschicht" zusammenhängen. (52, 32)

Aufgrund von morphologischen und histochemischen Untersuchungen kann heute gesagt werden, daß die Phospholipide in den Alveolarzellen vom Typ II durch osmiophile Granula gebildet werden. (85, 93, 106, 145) Diese osmiophilen Granula treten nach der 20. Schwangerschaftswoche im Zelltyp II auf. Die Zahl dieser Granula, die in die Auskleidungsschicht der Alveolen sezerniert werden, nimmt mit dem Gestationsalter zu. Nach der 24. Schwangerschaftswoche ist auch die Oberflächenaktivität von Lungenextrakten in zunehmendem Maße nachweisbar. Die Menge der Phospholipide steigt nach der 20. Schwangerschaftswoche an und bewirkt einen kontinuierlichen Abfall der Oberflächenspannung in den Lungenalveolen. In der 36. Schwangerschafts-

woche kommt es zu einem abrupten Anstieg der Phospholipide. (145) Die Halbwertszeit der oberflächenaktiven Phospholipide (hauptsächlich DPPC, in wesentlich geringeren Mengen Phosphatidyl-dimethyl-äthanolamin, Sphingomyelin, Phosphatidylinosit) beträgt weniger als 14 Stunden. (156, 48,12) Das bedeutet, daß unter normalen Bedingungen der Alveolarzelltyp II die Fähigkeit besitzen muß, ständig Phospholipide zu produzieren. Die Ursache des plötzlichen Anstiegs der Phospholipide in der 36. Schwangerschaftswoche ist noch nicht vollständig geklärt (26).

Massaro (108) zeigte unter Verwendung von Tritium-markierten Lipid- und Proteinvorstufen, daß die Radioaktivität sich rasch vom rauhen endoplasmatischen Reticulum über den Golgi-Apparat zu den lamellären Einschlußkörpern bewegte. Dabei ist noch nicht eindeutig geklärt, ob die Zusammenlagerung von Proteinen und Lipiden schon intracellulär oder erst extrazellulär nach Verlassen der lamellären Einschlußkörper erfolgt. (53, 62) Dementsprechend könnte man die Funktion der Proteine dahingehend deuten, daß sie als Begleitsubstanzen der Lipid-Synthese die plötzliche Ausschüttung der Phospholipidvorräte aus den lamellären Einschlußkörpern um die 36. Schwangerschaftswoche bewirken oder zumindest unterstützen. Darüber hinaus könnte ihre Funktion darin bestehen, die Ausbreitung und Adsorption der Lipidmoleküle an der Oberfläche zu fördern (87). Diese Deutung beruht auf der Feststellung, daß sich Lecithin in vitro nur sehr langsam auf der Oberfläche von Ringerlösung ausbreitet, während die Adsorption des Surfactant an die Alveolen in vivo sehr rasch erfolgt, sowohl während der ersten Atemzüge nach der Geburt als auch nach experimentell gesetzten Atelektasen. (94)

2.4. Lecithin und Lungenreife

Kinder mit RDS sind fast ausschließlich Frühgeborene, deren Lungen noch nicht ausgereift sind, d.h. nicht über eine ausreichende Menge an oberflächenaktivem Material verfügen. Das RDS wird darum als "Disease of Development" bezeichnet und

setzt einen für den Feten und das Neugeborene spezifischen Zeitplan der Lecithinsynthese voraus. Shelley, Takagi und Balis (160) zeigten, daß das Fruchtwasser von Kindern, die nach der Geburt ein RDS entwickelten, keine Oberflächenaktivität aufwies. Dies war jedoch nicht durch einen unzureichenden Gehalt an Phospholipiden bedingt. Daraus folgerten sie, daß der Qualität der Phospholipide unter Umständen eine größere Bedeutung zukommt als ihrer Quantität. (157)

Gluck (59) publizierte 1972 seine Untersuchungsergebnisse über die verschiedenen Synthesewege des Lecithins im menschlichen Fetus und Neugeborenen und ihre Beziehung zum RDS. Die unterschiedliche chemische Zusammensetzung der End- und Zwischenprodukte könnte eine Erklärung für die "qualitativen" Unterschiede sein, die von Shelley et al. (160) postuliert wurden. Man unterscheidet grundsätzlich zwei Synthesewege:
Vor der 35. Schwangerschaftswoche wird der sogenannte "zweite Syntheseweg" (Methylation-pathway) beschritten:

Adenosyl-L-methionin $\longrightarrow$ Methylgruppe (CH_3) +
Phosphatidyläthanolamin (PE) $\longrightarrow$
Phosphatidylmethyläthanolamin +
Methylgruppe (CH_3) $\longrightarrow$ Phosphatidyldimethyläthanolamin (PDME)
+ Methylgruppe (CH_3) $\longrightarrow$ Lecithin (= Phosphatidylcholin (PC))

Hierbei sind das Zwischen- (PDME) sowie das Endprodukt (PC) in α- Stellung hauptsächlich mit Palmitinsäure (C_{16}), in β-Stellung dagegen zu 68 - 82 % mit Myristinsäure (C_{14}) substituiert. PDME erscheint in Lungenaspiratflüssigkeit frühestens in der 22. - 24. Schwangerschaftswoche, was einen Rückschluß auf den Beginn der Lecithin-Synthese durch Methylierung zuläßt. Tatsächlich zeigte sich in Präparaten aus homogenisiertem fetalen Lungengewebe der 18. - 20. Schwangerschaftswoche kein Einbau von Methylgruppen. Zu diesem Zeitpunkt besteht in der Lunge noch ein absoluter Mangel an Methyl-Transferase. Die Syntheseaktivität des zweiten Weges ändert sich nach Epstein und Farrel (89) von der 22. - 24. Schwangerschaftswoche an nicht mehr wesentlich, wobei das Nettoprodukt an α, β -di-gesättigtem Lecithin relativ niedrig liegt.

Die Synthese des symmetrischen DPPC scheint für die Lunge eine besondere Schwierigkeit darzustellen. Sie ist hauptsächlich dem sogenannten "ersten Syntheseweg" (Choline-incorporation-pathway) vorbehalten (Kennedy 135):

- Diglycerid (DG) + Cytidin-Diphosphat (CDP) ⟶ Phosphatidylcholin (PC) + Cytidin-Monophosphat (CMP) (Kennedy)
- Phosphatidylcholin (PC) ⟶ Lyso-Phosphatidylcholin (LPC) + Fettsäure (FA) (Deacylierung)
- Lysopalmityl-Phosphatidylcholin + Palmityl-CoA ⟶ Dipalmityl-Phosphatidylcholin (DPPC) (Lands)
- 2 Lysopalmityl-Phosphatidylcholin ⟶ Dipalmityl-Phosphatidylcholin (DPPC) + Glycerophosphorylcholin (GPC) (Marinetti)

Katalysierendes Enzym der Schritte nach Lands und Marinetti ist die Phospholipase A_2 (PLA_2).
Der "Choline-incorporation-pathway" läßt drei Phasen unterscheiden:

1) geringe Syntheserate in der Frühschwangerschaft (vor der 22. Schwangerschaftswoche)
2) plötzlicher Anstieg gegen Ende der Schwangerschaft (nach der 36. Schwangerschaftswoche)
3) Rückkehr zu einer niedrigeren Produktionsrate in der späten Schwangerschaft (nach der 40. Schwangerschaftswoche).

Dieser Weg darf als dominierend in der Lecithin-Synthese betrachtet werden.

Gluck (59) untersuchte Lungenaspirat von Neu- oder Frühgeborenen mit RDS. Er zeigte, daß Hypothermie, Hypoxie und Azidose sowie Hyperkapnie selektiv die Methylierung hemmen, während sie nur einen geringen Einfluß auf den ersten Syntheseweg haben. In Präparaten aus homogenisiertem Lungengewebe von Frühgeborenen, die am RDS verstarben, wurde in der Aceton-präzipitierten Fraktion hauptsächlich α-palmityl-β-myristyl-Phosphatidylcholin nachgewiesen, das bei in vitro Versuchen mit der Wilhelmy-Waage eine geringere Oberflächenaktivität zeigte als DPPC, das aus Lungengewebe von Neugeborenen, die an anderen Krankheiten verstorben waren, gewonnen wurde.

Gluck schloß daraus, daß die Fähigkeit des menschlichen Organismus, in der Lunge Lecithin durch Methyleinbau zu synthetisieren, es möglich macht, daß Frühgeborene zunächst überleben können und dann ein RDS entwickeln. Kaninchen und Schafe, denen dieser zweite Syntheseweg fehlt, sterben sogleich an respiratorischer Insuffizienz. Entsprechend ist es bei Kindern, bei denen der "Methylation-Pathway" gehemmt wird. Erfolgt diese Hemmung vor der 36. Schwangerschaftswoche und ist ihre Lunge noch nicht genügend ausgebildet, d.h. der erste Syntheseweg noch nicht in ausreichendem Maß entwickelt, so erliegen sie der respiratorischen Insuffizienz durch progredienten alveolären Kollaps.

2.5. Meßgrößen zur Bestimmung der Lungenreife

2.5.1. Messung der Oberflächenspannung

Vielfach hat man versucht, die Wirkung des Surfactant mit der mechanischen Lungenfunktion in Verbindung zu setzen. Keines der verwendeten Modellsysteme zeigte jedoch befriedigende Ergebnisse.
Young et al. (187) wies in einem Lungen-Druck-Volumen-Diagramm nach, daß, wenn die Lunge nach maximaler Aufblähung auf einem end-exspiratorischen Druck von 3 cm Wassersäule gehalten wird, die Compliance innerhalb von 20 Min. um 42 % abnimmt, während die alveoläre Oberfläche nur um 10 % vermindert wird. Radford (144) versuchte die totale alveoläre Oberfläche von einem angenommenen Wert der alveolären Oberflächenspannung zu berechnen. Bei diesem Versuch treten jedoch stark variierende Ergebnisse auf - je nach der Höhe des angenommenen Wertes der Oberflächenspannung. Weiterhin machte man sich Gedanken über die Ursache der Hysteresis im Druck-Volumen-Diagramm bei In- und Deflation. In dieser Fragestellung spalteten sich die Untersucher in zwei Lager. Die Mehrheit (112) begründet die Hysteresis durch einen exzessiv steilen Anstieg der Oberflächenspannung während Inflation, während die anderen glauben, daß die Flächen-Volumen-Hysteresis in einer geometrischen Irreversibilität begründet liegt. (76)

Neben den physiologisch-anatomischen Studien bemühte man sich auch um in vitro-Experimente, die sich jedoch in der Mehrzahl als sehr komplex herausstellten. Goerke (62) schreibt: "Transferring such a bouillabaisse (surfactant) to the air/water-interface of a model system in a reproducible manner is a tour de force, but nevertheless necessary for study of the material's physical properties." Viele Fehlerquellen, z.B. das Auftreten spezieller Hemmfaktoren, zu radikale Behandlung, Veränderung durch Lagerung, Verlust bei Reindarstellung etc. können in diese Untersuchungen eingehen und sie verfälschen.

Zwei Verfahren setzten sich mehr und mehr durch: Der "Bubble"-Test von Pattle (137, 138) und die Wilhelmy-Waage (182). Durch Bestimmung der Größe-Zeit Beziehung von Flüssigkeit-bedeckten Luftblasen mit einem Durchmesser von einigen Mikrometern, konnte man auf die Oberflächenspannung der Luft(Bläschen)/Wasser-Grenzschicht schließen. Der Lungensurfactant ermöglicht stabile Bläschen herunter bis zu einem Durchmesser von 20 Mikrometern, während Blasen, die in Gegenwart der meisten anderen Substanzen gebildet wurden, schon viel früher kollabieren. (Diese Ergebnisse sind Grundlage des von Clements (23, 24) proklamierten Schütteltests.) Das Verfahren läßt sich jedoch nicht quantitativ auswerten.

Mit der Wilhelmy-Waage, die in zwei geringfügig differierenden Modifikationen ihre Verwendung findet, ist es möglich, die Oberflächenspannung in einem Bereich von 0-25 dyn/cm relativ exakt zu messen. (182) Das Surfactant-Material wird direkt und vollständig auf die Luft/Wasser-Grenzfläche aufgetragen, was jedoch mit einigen Problemen verbunden ist. Bei Temperaturen unter 41° dauert es Tage, bis ein Kristall von DPPC sich vollständig auf der Oberfläche ausgebreitet hat, während nach Zugabe einer Spur Chloroform oder Äther dieser Prozess innerhalb weniger Sekunden abläuft. Eine Temperaturerhöhung auf 45° verkürzt nach Vilallonga (177) die Zeit auf zwei Stunden. Dieser Umstand unterstützt das Argument der Autoren, nach deren Auffassung der Surfactant aus mehr Substanzen als allein DPPC bestehen muß, um sich während Inspiration schnell auf der ganzen Alveolaroberfläche ausbreiten zu können. (87) Ob unter diesen Substanzen andere Phospholipide, Proteine oder Verbin-

dungen anderer Stoffklassen zu verstehen sind, steht nach wie vor in Diskussion. In jedem Fall muß man bei der Verwendung von Lösungsmitteln zur besseren Verteilung des Lipids Vorsicht walten lassen, daß sie nicht in dem Surfactant-film zurückgehalten werden und die Oberflächenspannung beeinflussen. Benzin und langkettige Lösungsvermittler sind unbedingt zu vermeiden. (119)

2.5.2. Bestimmung der Phospholipide

Der plötzliche Anstieg des Lecithins um die 36. Schwangerschaftswoche ist weithin akzeptiert. Jedoch treten je nach Technik der Isolierung, Versuchsanordnung und quantitativer Auswertung Unterschiede in Beginn, Steilheit und Höhe des Lecithin-Anstiegs auf. Daraus folgt eine starke Inkongruenz der Kurven verschiedener Untersuchungen und verschiedener Autoren. Diese Überlappung, die eindeutige Aussagen über Schwangerschaftsalter bzw. fetale Lungenreife - die 36. Schwangerschaftswoche wird im allgemeinen mit einer ausreichenden Lungenreife gleichgesetzt - erschwert, kommt noch stärker zum Ausdruck bei Schwangerschaften, die durch Rhesusinkompatibilität, Diabetes mellitus, Hypertonie, EPH-Gestose, Placentainsuffizienz etc. kompliziert sind.
Mehrfach untersuchte man die Korrelation verschiedener Methoden:

a) Konzentration der gesamten Phospholipide im Fruchtwasser
b) Konzentration des Lecithins im Fruchtwasser
c) Lecithin-Sphingomyelin-Verhältnis (L/S-Ratio) im Fruchtwasser

zu Schwangerschaftsalter und Lungenreife. Auch in dieser Frage kam es zu divergierenden Aussagen. Nach Borer (11) bietet die L/S Ratio-Bestimmung eine 97 %ige Treffsicherheit bezüglich der Voraussage der Lungenreife.
Eine Korrelation der L/S-Ratio zum aktuellen Schwangerschaftsalter besteht nur in "normalen" Schwangerschaften, während in komplizierten Schwangerschaften eine Beschleunigung oder Verlangsamung des Anstiegs der L/S-Ratio erfolgt. Es wurde ge-

zeigt (118), daß Kinder diabetischer Mütter, die aufgrund einer "reifen" L/S-Ratio zu einem frühen Schwangerschaftsalter entbunden wurden, häufiger am RDS verstarben als die, die mit der gleichen L/S-Ratio zu einem späteren Zeitpunkt geboren wurden. Roux (151) setzt die L/S-Ratio weniger mit der Lungenreife als vielmehr mit der allgemeinen Reifung des Organsystems des Feten ("over-all fetal organ maturation") in Beziehung. Wahrscheinlich liegt auch in dieser Frage die Lösung in der sich gegenseitig ergänzenden Anwendung der verschiedenen Stellungnahmen und nicht in ihrem gegenseitigen Ausschluß.

Die Methoden zur Bestimmung der fetalen Lungenreife aufgrund des Phospholipidgehaltes im Fruchtwasser lassen sich in drei Gruppen (s.o.) einteilen (145):

- die quantitative Bestimmung des Lecithins (Bhagwanani-Nelson)
- die Messung der Gesamtmenge an Phosphorlipid-Phosphor im Fruchtwasser (Nelson, Clements)
- die Messung des Lecithin-Sphingomyelin-Verhältnisses (L/S-Ratio) (Gluck).

Bhagwanani (8) bestimmte die Gesamtkonzentrationen der Phospholipide und der Lecithine. Die Gesamtphospholipidmenge wird aus dem Phosphorgehalt (Methode nach Bottcher) errechnet. Die Trennung des Lecithins von anderen Phospholipiden erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie. Bhagwanani nannte eine Lecithinkonzentration von 3,5 mg/dl (das entspricht einem Phosphorgehalt von etwa o,100 mg/dl nach Nelson (122, 126)) als kritische Grenze. Bei höher liegenden Meßwerten ist das Auftreten eines RDS unwahrscheinlich.
Die "colorimetrische Methode" von Gusdon und Waite 1972 (66) beruht auf der unterschiedlichen Hydrolysierbarkeit der Phospholipide. Im hydrolysierten Material findet sich hauptsächlich Lecithin (etwa 70 %) und andere Phospholipide in niedrigeren Konzentrationen. Der Rückstand nach Hydrolyse der Probe gibt den Gehalt an Sphingomyelin an. Die Menge der hydrolysierbaren Phospholipide soll ein zuverlässiger Parameter der Lungenreife sein. (145)

Nelson 1973 (125, 126) empfiehlt die Bestimmung der Gesamtmenge von Phospholipid-Phosphor im Fruchtwasser. Die Phosphormenge wird nach der Methode von Morrison (114, 115, 117) bestimmt. Die kritische Grenze von Gesamt-Phospholipid-Phosphor beträgt nach Nelson 0,140 mg/dl.

Bei der Auswertung der Ergebnisse muß beachtet werden, daß der Rückschluß von der Konzentration auf die an sich interessierende Gesamtmenge nur mit Einschränkungen möglich ist. Bei Polyhydramnie würde man beispielsweise als Folge der stärkeren Verdünnung der Phospholipide falsch-negative Befunde erwarten. Nelson konnte - allerdings nur bei wenigen untersuchten Fällen - keine Beziehung zwischen Fruchtwasser- und Phospholipidmenge finden. (125, 126)

Bhagwanani (8) vermutete als theoretischen Nachteil der Konzentrationsbestimmung irreführende Werte durch größere oder kleinere Fruchtwasservolumina. In seinen Untersuchungen jedoch waren die Konzentrationsangaben - unabhängig von der Fruchtwassermenge - von großer prognostischer Aussagekraft.

Caspi (17) untersuchte ebenfalls den Einfluß des Fruchtwasservolumens auf die Phospholipid- und Lecithinkonzentration. Nach der Methode von Charles und Jacoby bestimmte er unter Verwendung von PAH die Fruchtwassermenge. Er zeigte, daß das Fruchtwasservolumen bis zur 36. Schwangerschaftswoche zunimmt und dann allmählich wieder abfällt. Dagegen ist sowohl für die Lecithinkonzentration wie auch für den Gesamtlecithingehalt ein kontinuierlicher Anstieg bis zum Ende der Schwangerschaft zu verzeichnen. Die Fruchtwasservolumina variieren ebenso wie der Lecithingehalt in weiten Grenzen und lassen eine negative Korrelation zur Lecithinkonzentration erkennen. Sie erlauben jedoch allein keine verläßliche Aussage über Schwangerschaftsalter oder fetale Lungenreife.

Falconer (43) bestätigte durch eigene Untersuchungen den Grenzwert der Lecithinkonzentration im Fruchtwasser von 3,5 mg/dl. In Grenzfällen aber sprach er dem Gesamtlecithingehalt im Amnionsack größere prognostische Bedeutung zu und verwendete ihn mit einem Grenzwert von 20 mg/Amnionsack als Hilfsparameter.

2.5.3. Bestimmung der L/S-Ratio

Die Bestimmung der L/S-Ratio, die die bisher am weitesten verbreitete Methode zur Voraussage der fetalen Lungenreife darstellt, scheint die Methode der Wahl zu sein, zumal sie als einfach in der Durchführung gilt.(58, 59, 60, 9, 26, 107) Die Werte zeigen sowohl bei normalen wie bei pathologischen Schwangerschaften die beste Korrelation zur Lungenreife. Zwei Begründungen werden unter anderem für die - im Vergleich zur Bestimmung der Lecithinkonzentration - besseren klinischen Ergebnisse angegeben:

1. Die Bestimmung der L/S-Ratio scheint unabhängig vom Fruchtwasservolumen, das in der Amnionhöhle vorliegt,zu sein. (43) Die Sphingomyelinmenge im Fruchtwasser ist im Verlauf der normalen und pathologischen Schwangerschaften konstant bzw. unterliegt nur geringfügigen Schwankungen.(3) Um die 26. Schwangerschaftswoche ist ein geringfügiger Anstieg mit einer Rückkehr zu den Ausgangswerten um die 35. Schwangerschaftswoche zu bemerken. Änderungen in der Sphingomyelinkonzentration spiegeln somit fast ausschließlich Änderungen des Fruchtwasservolumens wider.

2. Wahrscheinlich dient das Sphingomyelin als innerer Standard zur Korrektur der Phosphatidverluste während des Aufarbeitungsganges, die aufgrund der Neigung der Phospholipide zu Adsorption und Micellenbildung zu erwarten sind. Bei der Aufarbeitung der Probe verhält sich Sphingomyelin wie Lecithin, so daß Verluste an Phospholipiden sich auf beide Fraktionen in gleicher Weise auswirken.
Die L/S-Ratio-Werte im Fruchtwasser von Neugeborenen zeigen eine Gauß'sche Verteilung. Badham und Worth (6) untersuchten 100 Fruchtwasserproben von 70 normalen Schwangerschaften und fanden als Normalbereich (95 %-Vertrauensbereich) Werte zwischen 2,1 und 11,0 bei einem Mittelwert von 6,7.
Obwohl diese Methode nur semiquantitativ ist und nach den Kriterien der analytischen Chemie, nach Präzision und Richtigkeit einer Lecithinbestimmung oft als unbefriedigend klassifiziert wurde, zeichnet sie sich doch durch eine bisher unerreichte Korrelation mit dem klinischen Befund aus und wurde in vielen Arbeiten als Referenzmethode verwendet.

Aus der Reihe der Kritiken sei folgende stellvertretend für andere herausgegriffen:
Schirar (157) macht gegenüber der Methode jedoch eine Reihe kritischer Einschränkungen. Er bemängelt die fehlende Signifikanz der L/S-Ratio in der Vorhersage der Lungenreife bei Werten kleiner als 2, selbst wenn die Probe nur wenige Stunden vor der Entbindung entnommen wurde. Die Zahl der falsch positiven Ergebnisse liegt im Vergleich zu den falsch-negativen, die praktisch überhaupt nicht auftreten, relativ hoch. Die Zentrifugation mag dabei - wie später noch ausgeführt und mit konkreten Zahlen belegt wird - eine nicht unwesentliche Rolle spielen. Sie betrifft jedoch in gleicher Weise die Bestimmung der Konzentration der Gesamtphospholipide, des Phosphatidylglycerins wie auch die Fettsäurezusammensetzung.
Schirars Kritik konzentriert sich auf folgende Punkte:

a) Die Sphingomyelinkonzentration ist kein konstanter Wert, weder im Verlauf der Schwangerschaft noch in verschiedenen Fruchtwasserproben. Sie kann darum nicht als interner Standard dienen. Diese Meinung bestätigt Rosenthal (149) durch eigene Versuche. Gluck (58) dagegen hat die gleichbleibende Sphingomyelinkonzentration, die im Vergleich zur Lecithinkonzentration nur Abweichungen im Bereich des Standardirrtums aufweist, durch entsprechende Untersuchungen dargelegt.
b) Die Qualität der Phospholipide, besonders der oberflächenaktiven Substanzen, ist wahrscheinlich entscheidender als ihre Quantität.
c) Das Verhältnis von Aceton-präzipitiertem zu Gesamtlecithin streut zwischen 11 und 65 % und kann darum nicht, wie von Gluck vorgeschlagen (58), als zusätzlicher Parameter bei Werten im Übergangsbereich dienen.

3. Die L/S-Ratio

3.1. Methode von Gluck

a) Transabdominelle Amniocentese zur Gewinnung von Fruchtwasser
b) Zentrifugation des Fruchtwassers zur Entfernung von Zellbestandteilen
c) Lipidextraktion
d) Acetonpräzipitation
e) Auftrag auf mit Kieselgel beschichteten Dünnschichtplatten
f) Entwicklung im Fließmittel
g) Besprühen mit Farbreagenz oder mit Schwefelsäure plus anschließendes Verkohlen
h) Densitometrische Auswertung
i) Berechnung mit Hilfe von Standardgemischen, die gleichzeitig mit der Probe mitentwickelt werden.

Diese grundsätzlichen Schritte, die bis auf die Acetonpräzipitation von den meisten Autoren übernommen wurden, zeigten in den verschiedenen Versuchsanordnungen mehr oder weniger große Modifikationen.

Gravierende Meinungsunterschiede herrschten über den Wert der Acetonpräzipitation ebenso wie über die Methode der Auswertung. Dabei kamen neben der Auflicht-Densitometrie (61) die Planimetrie (Quotient der Flächenintegrale) (26), der visuelle Vergleich (151) (evtl. der Mittelwert der Beurteilungen dreier Beobachter), die Gravimetrie (direktes Wägen der von Dünnschichtplatten abgekratzten Lipidflecken), die Fluoreszenzmessung (bei Rhodamin G) (26) und die Autoradiographie (129) zur Anwendung.

3.2. Übersicht über Modifikationen in den einzelnen Analysenschritten

Für die Bestimmung der L/S-Ratio sind außerordentlich viele Modifikationen publiziert worden, deren Bedeutung aus der Literatur selbst oft nur schwer abzuschätzen ist. Es soll daher im folgenden zunächst dargestellt werden, an welcher Stelle

des Analysenganges Modifikationen möglich sind. Die wichtigsten werden anschließend im Detail diskutiert.

3.2.1. Wahl des Untersuchungsmaterials
- a) normale oder komplizierte Schwangerschaft
- b) Zeitpunkt der Fruchtwasserentnahme (Schwangerschaftsalter)
- c) Art der Probennahme (Amniocentese, vaginal)
- d) Menge der Probe
- e) Kontamination (Blut, Mekonium, Vernix caseosa)

3.2.2. Zentrifugation des Fruchtwassers
- a) durchgeführt oder nicht
- b) zu welchem Zeitpunkt
- c) Art der Zentrifuge
- d) Zentrifugalbeschleunigung
- e) Dauer
- f) Temperatur

3.2.3. Aufbewahrung
- a) Dauer
- b) Temperatur -18^{o} (oder bei $+4^{o}$ bis -18^{o} und kühler)
- c) in welchem Zustand (vor oder nach der Zentrifugation, vor oder nach der Extraktion)

3.2.4. Isolierung der Lipide
- a) Art der Extraktion (flüssig-flüssig, Säulenextraktion)
- b) Anzahl der Extraktionsschritte
- c) Zusammensetzung des Extraktionsmediums und Mengenverhältnis von Extraktionsmedium und Fruchtwasser
- d) zusätzliche Verfahren zur Verbesserung der Phasentrennung.

3.2.5. Acetonpräzipitation
- a) grundsätzlich kontroverse Auffassungen über den Wert dieses Schrittes
- b) Art der Durchführung (Mengenverhältnisse, Kühlungsdauer und Temperatur)
- c) Sauberkeit des Acetons

3.2.6. Probenauftrag
- a) Menge der Probe
- b) Art des Auftrags (manuell, spezielle Applikatoren oder Auftrageplättchen)
- c) Art der Kieselgelplatten

3.2.7. Entwicklung im Fließmittel
- a) Zusammensetzung des Fließmittels
- b) Dauer der Entwicklung
- c) Temperatur, Luftfeuchtigkeit

3.2.8. Verwendung von Standards
- a) Hersteller der Standards
- b) Art des Standards (z.B. DPPC oder "egg-yolk-standard")
- c) Konzentration des Standards

3.2.9. Färbung und Veraschung
- a) Reagenzien
- b) Auftragstechnik
- c) Stabilität der Färbung

3.2.10. Quantitative Auswertung

3.2.1. Wahl des Untersuchungsmaterials

Nur die wenigsten Autoren machen genauere Angaben über das von ihnen verwendete Untersuchungsmaterial. Gluck (58) untersuchte in seiner Studie von 1971 302 Fruchtwasserproben, die nur durch Amniocentese gewonnen worden waren. Dabei ordnete er sie nach dem Schwangerschaftsalter, die medizinische Indikation für die Amniocentese ließ er jedoch unerwähnt.
Schirar (157) verwendete 373 Fruchtwasserproben von 305 Patientinnen mit unkomplizierten Schwangerschaften. Das Fruchtwasser wurde hauptsächlich durch Amniocentese, zum Teil aber auch während Blasensprengung oder Kaiserschnitt gewonnen.
Coch (26) charakterisierte seine Proben nur durch die Angabe, daß man das Fruchtwasser innerhalb von 24 Stunden vor der Entbindung abgenommen hatte. Die Proben, die in Glucks Studie von 1974 (61) untersucht wurden, stammten hauptsächlich aus Amniocentesen und zwar aus fetaler wie maternaler Indikation.

Gebhardt (49) verwendete hauptsächlich Fruchtwasser von Patientinnen mit Rh-Immunisation. Bei einer L/S-Ratio von größer als 2 fand die Entbindung gewöhnlich innerhalb von 72 Stunden statt.
Morrison (114) gewann das Fruchtwasser durch transabdominelle Amniocentesen, dabei lag jedoch kein Fall von fetalen oder maternalen Komplikationen vor.
Im allgemeinen wird mit Blut oder Mekonium kontaminiertes Fruchtwasser von der Phospholipidbestimmung ausgeschlossen. Allerdings ist gerade in komplizierten Schwangerschaften, in denen die L/S-Ratio-Bestimmung erst eigentlich sinnvoll ist, die Wahrscheinlichkeit sehr viel geringer, unkontaminiertes Fruchtwasser zu erhalten. Denn gerade mekonium- und blutig gefärbtes Fruchtwasser ist ein Alarmsignal, das die Notwendigkeit einer frühzeitigen Entbindung anzeigt.
Harding (72) untersuchte ebenfalls den Einfluß von Blutbeimengungen zum Fruchtwasser. Er bestimmte die Lecithin- und Sphingomyelinkonzentration und außerdem die L/S-Ratio von unkontaminiertem Fruchtwasser, das mit steigenden Mengen von Blut vermischt wurde. Dabei zeigte sich, daß sowohl die Lecithin- wie auch die Sphimgomyelinkonzentration anstiegen, während die L/S-Ratio abnahm.
Buhi und Spellacy (14) versuchten die Aussagen Hardings zu differenzieren. Sie untersuchten die Änderung der L/S-Ratio nach Kontamination des Fruchtwassers mit Serum. Während die Serumbeimengung (fetal oder maternal) zu reifem Fruchtwasser ($L/S > 2$) die L/S-Ratio sinken läßt, so steigt sie bei Serumzugabe zu unreifem Fruchtwasser ($L/S < 1{,}4$) an. Die Mischung mit Mekonium vermindert die L/S-Ratio in reifem wie in unreifem Fruchtwasser.

3.2.2. Zentrifugation des Fruchtwassers

Erster Schritt in der Verarbeitung des Fruchtwassers ist die Zentrifugation der Probe. Die Angaben der einzelnen Autoren über Dauer und Geschwindigkeit der Zentrifugation zeigen breite Variationen.

Tabelle I Zentrifugationsbedingungen des Fruchtwassers

Spellacy (166)	2000 U/min	10 Min.
Keniston (83, 84)	2000 U/min	15 Min.
Kynast (95, 96)	3000 U/min	5 Min.
Gluck (61)	5400 U/min	5-10 Min.
Olson (132)	500 g	2 Min.
Badham (6)	825 g	5 Min.
Coch (26)	800-1000 g	10 Min.
Mallikarjuneswara (107)	1000 g	20 Min.
Verder (174)	1100 g	5 Min.
Blass (9)	4500 g	2-5 Min.
Thom (171)	3000 g	10 Min.
Sarkozi (153)	12000 g(=10000 U/min)	10 Min.

Ziel der Zentrifugation vor der Lipidextraktion ist die Entfernung von zellulären und membranösen Anteilen im Fruchtwasser (besonders Erythrocyten, fetale Haut- und Alveolarzellen etc.), die alle Phospholipide enthalten. Nach Kiyasu (88) liegen Lecithin und Sphingomyelin im Fruchtwasser weder in Lösung noch als Micellen vor, sondern hauptsächlich membrangebunden. Olson (132) zentrifugiert der Beschreibung Kiyasus (88) entsprechend bei niedrigen Geschwindigkeiten nur 2 Minuten lang, um so den Verlust an interessierenden Phospholipiden möglichst gering zu halten.

Neben den in Lösung oder als Micellen vorliegenden Lipiden und Lipidkomplexen sind auch die membrangebundenenPhospholipide durch die Folch-Extraktion extrahierbar. Entsprechend spielt es eine nicht unbedeutende Rolle bei der Konzentrationsbestimmung, wie lange und mit welcher Geschwindigkeit zentrifugiert wird. Weiterhin stellt sich die Frage bei der Beurteilung der L/S-Ratio, ob Lecithin und Sphingomyelin gleich fest und zu gleichen relativen Anteilen membrangebunden sind.
Während Quinlivan et al. bei Änderung der Zentrifugationsbedingungen keine signifikante Änderung der L/S-Ratio bemerkten (143), beobachteten Nelson (125) und Wagstaff (181) unabhängig voneinander einen bedeutenden Lecithinverlust bei hoher Zentrifugalbeschleunigung. Wagstaff (181) zeigte, daß man

die L/S-Ratio durch Änderung der Zentrifugationsbeschleunigung beeinflussen kann. Nach Zentrifugation mit 15000 g für 10 Min. ergab sich gegenüber der unzentrifugierten Probe ein Verlust an Lecithin von 91 %, an Sphingomyelin von 87 %. Abramovich et al. (1) fand nach Zentrifugation (3000 g / 10 Min. / 4°) 71 - 87 % des Lecithins der Probe im Präzipitat.

Verschiedene Autoren untersuchten den Einfluß der Zentrifugation auf Lecithinkonzentration und L/S-Ratio genauer. Kiyasu (88) wandte sich dabei verschiedenen "Zentrifugentypen" zu, in denen die Proben unterschiedlichen Zentrifugationsbeschleunigungen ausgesetzt wurden. Er findet - je nach Zentrifugentyp bzw. Zentrifugalbeschleunigung - unterschiedliche Ergebnisse.
Morrison (114, 115) erhält bei Zentrifugationen mit 1100, 1700, 2200, 2800 U/min identische Werte. Jedoch ist in dieser Studie zu beachten, daß die Unterschiede bei den Umdrehungszahlen zu gering sind, um signifikante Unterschiede zu ergeben.

Aufschlußreicher ist der Versuch von Cherayil (20). Eine Serie von 40 Fruchtwasserproben wurde unter verschiedenen Bedingungen zentrifugiert (bei 3520 g - 5 Min. lang und bei 27138 g - 15 Min. lang). Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der L/S-Ratio bei stärkerer Zentrifugation. Bei Proben mit einer L/S-Ratio größer als 4 bleibt dies ohne Folgen für die Interpretation, da auch nach der intensiveren Zentrifugation die Werte noch größer als 2 sind, d.h. als "reif" bewertet werden können. Bei 8 Proben mit einer L/S-Ratio zwischen 2 und 4 fiel der Wert bei 7 Proben unter 2 und mußte damit als "unreif" oder zumindest als Grenzwert beurteilt werden. Bei Proben mit einer L/S-Ratio kleiner als 1,8 wurde kein signifikanter Unterschied sichtbar.

Bei Vergleichen der Werte verschieden zentrifugierter Fruchtwasserproben mit der Lungenreife der Neugeborenen zeigte sich, daß die Rate an falsch negativen Ergebnissen bei niedriger Zentrifugalbeschleunigung signifikant kleiner ist (47,4 % gegenüber 15,8 %). In einer anderen Studie (45), in der mit 500 g - 2 Min. lang zentrifugiert wurde, fand sich eine sehr hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen.

Dieser Befund mag darin begründet sein, daß bei niedrigen Zentrifugationsbeschleunigungen Phospholipide, die nicht aus den fetalen Alveolen stammen, in der Probe bleiben, während bei hohen g-Zahlen auch alveoläre Phospholipide mit abzentrifugiert werden.

Vergleiche der Auftrennung verschieden zentrifugierter Fruchtwasserproben in der Dünnschichtchromatographie zeigten bei niedrigeren Zentrifugationsbeschleunigungen eine signifikant schlechtere Trennung der Lecithin- und Sphingomyelinflecken. Die beste Präzision wurde bei einer Zentrifugation mit 3000 g - 10 Min. erreicht.
Bei Zentrifugationsbeschleunigungen zwischen 350 und 2800 g - in diesem Bereich zentrifugierten die meisten Autoren - wurde nach den Ergebnissen Cherayils eine breite Streuung der Werte der L/S-Ratio, aber in noch höherem Maße der Lecithinkonzentration, die er daneben stellte, sichtbar.

Er folgerte aus seinen Untersuchungen, daß man momentan noch keine ideale Anweisung über Zentrifugationsbeschleunigung und -zeit geben kann. Er schlug als vorläufigen Richtwert die Zentrifugation bei 3000 g / 10 Min. / 4° vor.

3.2.3. Aufbewahrung

Die Frage, ob sich schon innerhalb von Stunden bis zur Verarbeitung der Probe irgendwelche Änderungen der Phospholipidkonzentration im Fruchtwasser ergeben, ist von praktischem Interesse.

Selbst in diesem Punkt gehen die Meinungen auseinander: Während Badham (6) der Aufbewahrung, selbst bei Raumtemperatur keinen Einfluß zubilligt (er untersuchte die Proben in Intervallen bis max. 2 Wochen), beobachtete Gluck (61) eine signifikante Verminderung der L/S-Ratio, wenn die Probe über Nacht bei Raumtemperatur belassen wird. Bhagwanani (8) fand, daß die Lecithinkonzentration um 7-10 % vermindert ist, wenn man das Fruchtwasser länger als 3 Stunden bei 22° stehen läßt. Dieser Effekt wird der im Fruchtwasser vorhandenen Phospholipa-

se zugeschrieben, die Lecithin zu Lysolecithin deacyliert. Diese enzymatische Zersetzung kann nach Verder (174) durch Zugabe von 10 %ige Trichloressigsäure oder einer 10 %igen EDTA-Lösung vom pH 4 verhindert werden.

Die Haltbarkeit in eingefrorenem Zustand ist für die Verwendung eines Fruchtwasserpools zur Qualitätskontrolle von Bedeutung.
Verder (174) beobachtete keine Änderung der L/S-Ratio nach Tieffrieren, dagegen berichtete Bhagwanani (8) von einer Verminderung der Lecithinkonzentration um 20 - 40 % nach Tiefgefrieren über mehrere Wochen bis Monate. Schirar (157) begrenzte die zulässige Aufbewahrungsdauer im Gefrierfach bei - 20° auf maximal 7 Tage.
Spellacy (166) vertritt eine mögliche Aufbewahrung im gefrorenen Zustand bis zu 6 Monaten.
Die meisten Autoren kühlen die Probe bei Aufbewahrung über Nacht auf 4° ab und frieren sie ein, wenn eine Aufbewahrung über mehr als 12 Stunden notwendig ist.

3.2.4. Isolierung der Lipide

Ein weiterer Vorbereitungsschritt, der genauer betrachtet werden muß, ist die Extraktion.
Gluck (58, 61) bedient sich der bewährten Folch-Extraktion (45) (Extraktionsgemisch von $CHCl_3/CH_3OH$ im Verhältnis 2:1 v/v), wobei er das Verhältnis von Extraktionsmittel zu Fruchtwasser wie 3:1 wählt (FW:$CHCl_3$:CH_3OH = 1:2:1 v/v/v).
Diese Vorschrift ist im Laufe der letzten Jahre von den einzelnen Autoren mit dem Ziel einer vollständigeren Lipidextraktion mehr oder weniger stark modifiziert worden.

a) Badham (6) änderte das Mischungsverhältnis von $CHCl_3/CH_3OH$ auf 1:1 v/v, Nelson (123, 122) auf 1:2 v/v.
b) Eine Vielzahl von Variationen ergibt sich durch getrennte Zugabe der Extraktionsmittel, durch zusätzliches Mischen und Zentrifugieren und durch Zugabe von Flüssigkeiten, die die Trennung verbessern sollen.

Tabelle II gibt eine kurze Übersicht über die wesentlichen Unterschiede.

Tabelle II Extraktion von Phospholipiden aus Fruchtwasser

Nelson (122, 123) modif. Bligh/Dyer	36 ml FW + 40 ml CH_3OH + 20 ml $CHCl_3$ zentrifugieren mischen + 20 ml $CHCl_3$ zentrifugieren
Kiyasu (88)	1-2 ml FW + 5ml CH_3OH mischen 3 Min. bei 40° C. im Wasserbad 3 Min. zentrifugieren bei 500 g Überstand + 10 ml $CHCl_3$ + 2 ml KCl-Lösung (2mol/l) 1 Min. mischen wässrige Phase absaugen $CHCl_3$-Phase zweimal mit 3ml destilliertem Wasser waschen die durch Feuchtigkeit wolkige $CHCl_3$-phase bei 55° C. im Wasserbad unter N_2 evaporieren
Gusdon (66)	1,5 ml FW + 3 ml CH_3OH + 1,5 ml $CHCl_3$ mischen + 1,5 ml H_2O + 1,5 ml $CHCl_3$ trennen $CHCl_3$-Phase abziehen CH_3OH-Phase nochmals mit H_2O und $CHCl_3$ waschen $CHCl_3$-Phase zweimal mit H_2O waschen evaporieren
Blass (9)	1,5 ml FW + 1,5 ml CH_3OH 30 sec. mischen + 3 ml $CHCl_3$ 60 sec. mischen bei 4500 g 2-5 Min. zentrifugieren

Einige Autoren machen sehr genaue Angaben (z.B. Blass (9)), während andere nur grob summarisch die Reihenfolge ihrer Schritte beschreiben.

Die Intensität und Dauer des Mischens scheint nicht ohne Einfluß auf die Ergebnisse zu sein. Nach Kiyasu (88) liegen die meisten Phospholipide membrangebunden vor. Damit ist ihre Extrahierbarkeit gegenüber sich in Lösung befindlichen Phosphatiden mit Sicherheit eingeschränkt. Ihre Isolierung verlangt dementsprechend eine längere und intensivere Behandlung. Mischungszeiten von wenigen Sekunden bis zu einigen Minuten,

u.U. unterstützt durch zwischenzeitliche Erwärmung im Wasserbad, könnten folglich zu verschieden hohen Lipidkonzentrationen im Extrakt ein- und derselben Fruchtwasserprobe führen.

Über die Art der Extraktion besteht keine Einigkeit, wie aus der Tabelle II ersichtlich ist.
Olson (134) mischt ein Volumenanteil Fruchtwasser mit einem Volumenanteil Methanol und anschließend mit 2 Volumina Chloroform eine Minute lang. Die Chloroform-Phase wird abgezogen und die Methanol-Phase erneut mit 2 Volumenanteilen Chloroform versetzt. Jeweils vor Entfernung der Chloroform-Phase wird mit 12000 g/ 5 Minuten lang zur besseren Phasentrennung zentrifugiert. Beide Chloroform-Phasen werden vereinigt. "Two chloroform extractions were performed since it was shown that they were necessary for removing all the extractable phospholipids." (Olson 132)
Einige Autoren waschen zusätzlich die Chloroform-Phase mit destilliertem Wasser, um alle hydrophilen Bestandteile, die störend in die Auftrennung eingehen können, zu eluieren. (66)

Ein weiterer Einflußfaktor ist in der Phasentrennung zu sehen. Während einige Autoren die Entfernung der Chloroform-Phase nach einfachem Absetzen beider Phasen vornehmen (66, 88), unterstützen andere eine saubere Phasentrennung durch Zentrifugation. Wie aus Tabelle II hervorgeht, zentrifugiert Blass (9) beispielsweise bei 4500 g 5 Min. lang. Olson (132) dagegen in beiden Teilschritten jeweils 5 Min. bei 12000 g.

Badham (6) zeigte in seinen Versuchen, daß die Präzision der Phospholipid-Messungen in Fruchtwasserextrakten wesentlich schlechter war als die von Extrakten reiner Lecithin-Lösungen. Er führte das hauptsächlich auf die Extraktionsschritte zurück, denen er darum besondere Aufmerksamkeit schenkte. Den entscheidenden Einflußfaktor innerhalb der Extraktion sah er in einer unvollständigen Phasentrennung. Diese kann bestehen in:

a) einem Verlust der organischen Phase mit daraus resultierenden niedrigeren Phospholipid-Werten
b) einer Kontamination, z.B. bei Durchstoßen der Proteinzwischenschicht (die Chloroformphase liegt im Reagenzglas

unter der Methanolschicht) oder ungenügender Trennung bei Auslassen der Zentrifugation.

Unvollständige Trennung jedoch führt zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen.
Er untersuchte den Einfluß folgender Schritte:

a) zusätzliche Zentrifugation 1300 g / 15 Min. lang
b) Änderung des Extraktionsgemisches ($CH_3OH/CHCl_3$ = 1:1 v/v)
   Änderung des Volumenverhältnisses von Fruchtwasser zu Extraktionsgemisch auf 1:4 v/v
c) Zugabe von wasserfreiem Natriumsulfat zur Chloroform-Phase
d) mehrfache Extraktion

Die geringste Variation der Meßwerte (1,4 %) bei siebenmaliger Wiederholung des Versuches erhielt er mit der Methode, die Punkt a) und b) mit einschlossen. Mehrfache Extraktion verbesserte die Ergebnisse nicht.

Verschiedene Autoren verwendeten Trocknungsmittel ($MgSO_4$ anhydr., Na_2SO_4 anhydr.) mit dem Ziel, Reste von Feuchtigkeit aus der organischen Phase abzuziehen (6, 122, 123, 107, 120). Die Notwendigkeit dieses Schrittes steht in Frage, da die Chloroform-Phase nach Abtrennung von der wässrigen ja zur Trockne eingedampft wird.
Laut Badham (6) resultiert daraus sogar ein Verlust von Gesamtphosphatiden.
In allen seinen Versuchen arbeitete Badham mit unzentrifugiertem Fruchtwasser, um durch diesen Schritt verursachte Variationen auszuschalten.

Die wenigsten Untersucher gehen auf die Frage von Dicke, Dichte, Zusammensetzung und Konsistenz der sich bei der Extraktion bildenden Zwischenschicht ein. Sie hängt von der Extraktionsmethode, der Zentrifugation des Fruchtwassers vor der Extraktion, dem Schwangerschaftsalter (der Proteingehalt des Fruchtwassers nimmt im Verlauf der letzten Schwangerschaftswochen ab) und einer eventuellen Kontamination mit Blut, Mekonium oder Vernix caseosa ab. Die Zwischenschicht kann eine saubere Phasentrennung stören.

Der Einfluß der Apo-Proteine auf die Extraktion ist noch nicht eindeutig geklärt.
King (87) berichtet über drei Proteinfraktionen mit einem Molekulargewicht von 11000, 34000, 69000.
Grundlegende chemische Unterschiede bestehen zwischen den beiden Hauptproteinfraktionen (MG: 11000 und 34000).

a) Das Protein mit einem MG von 11.000
   1) ist aufgrund seiner hydrophoben Konstitution wasserunlöslich und äthanollöslich
   2) bindet bestimmte Lipide und zwar vorzugsweise saure Phospholipide in wässriger Lösung
   3) ist aufgrund seiner geringen Reaktivität mit dem spezifischen Antiserum gegen Surfactant vermutlich von einer Lipidmatrix eingehüllt und fungiert als "core".
   4) trägt durch seine hydrophoben Bindungen, die als die stärksten im gesamten Lipo-Protein-Komplex betrachtet werden, zur Festigkeit der Verbindung bei.

b) Das Protein mit dem MG von 34.000
   1) ist wasserlöslich und wird durch Äthanol präzipitiert
   2) reagiert stark mit dem Surfactant-Antiserum

Diesen beiden Fraktionen Kings entsprechen wohl die zwei Proteine S und T, die Scarpelli und Colacicco (156) in fraktionierten Lungenwaschungen fanden und durch Zentrifugation (49000 g / eine Stunde) trennten. Dabei fand sich "S" mit 60 % der Phospholipide im Bodensatz und "T" im Überstand.
Das "T"-Protein kann durch ein Methanol/Chloroform-Gemisch aus dem Überstand extrahiert werden, was vermuten läßt, daß es fest an Lipide gebunden vorliegt oder aus vielen hydrophoben Aminosäuren besteht. Damit wäre es dem Protein mit einem MG von 11000 (87) gleichzusetzen.
Das "S"-Protein befindet sich nach Extraktion mit dem Methanol/Chloroform-Gemisch in der wässrigen Phase und entspricht wohl dem Protein mit MG 34000.

Ob diese Proteine, die sich im Extraktionsprozeß unterschiedlich verhalten, die Extraktion und Isolation der Phospholipide beeinflussen, ist noch nicht ausreichend geklärt.

3.2.5. Acetonpräzipitation

Der wohl am meisten umstrittene Schritt in der Aufarbeitung des Fruchtwassers ist die Präzipitation von oberflächenaktivem Lecithin in eiskaltem Aceton, wie es von Gluck (57) vorgeschlagen worden war. Dieser Vorbereitungsschritt beruht auf der Hypothese, daß oberflächenaktive Phospholipide (hauptsächlich DPPC, aber auch Phosphatidylglycerin und andere) durch eiskaltes Aceton ausgefällt werden, während nicht oberflächenaktives Lecithin vollständig oder zumindest zu einem wesentlich höheren Prozentsatz in Lösung bleiben. Ziel der Acetonpräzipitation ist mithin die Trennung des "lungenspezifischen" Lecithins von einem Lecithinanteil, der fast ausschließlich aus extrapulmonalen Quellen stammt.

Gluck wies als erster auf die Notwendigkeit der Acetonpräzipitation hin und nahm sie folglich als einen unumgänglichen Vorbereitungsschritt in die Bestimmung der L/S-Ratio auf. In Pediat. Res. 1, 1967 (57) beschreibt er den Ablauf folgendermaßen:

a) Extrahiertes und über DEAE-Säulen fraktioniertes Lecithin wird unter N_2 zur Trockne eingedämpft
b) Zugabe von 10-20 µl Chloroform/ 3-4 mg Lecithin
c) tropfenweise Zugabe von eiskaltem (0°) Aceton, bis sich kein weiterer milchiger Niederschlag bildet
d) Zentrifugation bei $0-4^{\circ}$
e) Abdekantieren des Überstandes in ein anderes Röhrchen
f) weitere Zugabe von kaltem Aceton (etwa 1 ml/mg Lecithin) zum Präcipitat
g) Kühlung beider Röhrchen über Nacht bei 0 bis -4°
h) Vereinigung beider Präzipitate, evtl. erneute Auswaschung.

Diese Arbeitsanleitung, die man als grundlegend beurteilen darf, läßt sich bezüglich der Mengenangaben bei der Verarbeitung von Fruchtwasser nicht anwenden. Da Gluck in dieser Studie Lungenauswaschungen und homogenisiertes Lungengewebe verwendet, geht er auch von wesentlich höheren Lipidquantitäten aus.

Zum Vergleich sei nur folgende Konzentration genannt: Die kritische Grenze des Gesamtlecithins in 100 ml Fruchtwasser beträgt 3,5 mg. Bei einer Amniocentese werden durchschnittlich 10-20 ml Fruchtwasser gewonnen, was einer Lecithinmenge von 0,35-0,7 mg entspricht.

Gluck selbst wie auch viele andere Autoren verweisen in späteren Untersuchungen auf diese Arbeit von 1967 (57), ohne daß sich bei ihm eine detaillierte Beschreibung für Fruchtwasserproben findet.

Coch (26), der sich in seinem Arbeitsgang weitgehend an die Vorschriften Glucks hält, macht folgende Angaben zur Acetonpräzipitation:

a) Chloroform-Phase wird auf 0,1-0,2 ml eingedampft
b) Zugabe von 10 ml Aceton (0^{o})
c) Mischen
d) Kühlung bei -20^{o} eine Stunde lang
e) Zentrifugation (0 bis -4^{o} / 600 g / 5 Minuten lang)
f) Abdekantieren des Überstandes.

Zum Vergleich seien auch die Beschreibungen Verders (174) und Mallikarjuneswaras (107) aufgeführt:

Verder (174)

a) Chloroform-Phase zur Trockne eingedampft
b) Zugabe von 2 ml Aceton (0^{o}) - mischen
c) weitere Zugabe von 750 µl Aceton (0^{o})
d) Kühlen 15 Minuten lang, keine Temperaturangabe
e) Zentrifugation bei 0 bis -4^{o} / 1100 g / 3 Minuten lang
f) Abdekantieren des Überstandes.

Mallikarjuneswaras (107)

a) Chloroform-Phase zur Trockne eingedampft
b) Lösen in 10 µl Chloroform
c) Zugabe von 0,8 ml Aceton anhydr. (0^{o}) - mischen
d) Kühlen, 30 Minuten lang bei -12^{o}
e) Zentrifugation bei 2^{o} / 1000 g / 3-4 Min. lang
f) Abdekantieren des Überstandes.

Das Präzipitat wird bei allen Autoren vollständig getrocknet und anschließend in Chloroform aufgenommen.

Während Gluck (57), Coch (26) und Mallikarjuneswara (107) den evaporierten Extrakt erst in Chloroform lösten, bzw. nicht ganz bis zur Trockne eindampften, macht Verder (174) keine Aussage darüber. Offensichtlich gibt er das Aceton direkt auf das Präcipitat. Es erhebt sich die Frage, ob quantitative und evtl. auch qualitative Unterschiede entstehen

a) wenn man Aceton tropfenweise einem Trockenrückstand zufügt
b) wenn man Aceton tropfenweise einer Chloroformlösung zugibt
c) wenn man Aceton nicht tropfenweise, sondern gleich in einer größeren Menge verwendet, wobei sicher das Volumen auch nicht ohne Einfluß bleibt.

Diese Frage ist bisher aus der Literatur nicht zu beantworten.

Es stehen jedoch weniger die methodischen Varianten der Acetonpräzipitation im Mittelpunkt der Diskussion als vielmehr die grundsätzliche Frage über Notwendigkeit, Sinn, Problematik, Nach- und Vorteile. Der Auseinandersetzung mit dieser Frage soll eine Übersicht über die wichtigsten Autoren und ihre Stellungnahme zu diesem Schritt vorausgehen:

Tabelle III Aufstellung einiger Autoren, die die Acetonpräzipitation durchführen bzw. auslassen

Acetonpräzipitation	keine Acetonpräzipitation
Gluck (57,58,59,60,61)	Kynast (95,96)
Coch (26)	Bhagwanani (8)
Verder (174)	Olson (134)
Mallikarjuneswara (107)	Blass (9)
Jackson (79)	Nelson (122, 123)
Borer (11)	Roux (151, 152)
Spellacy (167, 168)	Singh (162, 163)
Morrison (115, 116)	Schirar (157)
Gebhardt (42, 43)	Harding (72)
Thom (171)	
Badham (6)	

Gluck (57) begründete in seiner Arbeit von 1967 die Acetonpräzipitation mit folgenden Versuchsergebnissen:

a) Oberflächenaktivität (mit der Wilhelmy-Waage gemessen) war nur in den aceton-präzipitierten Fraktionen von Lecithin, Sphingomyelin, Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidyldimethyläthanolamin nachweisbar.

b) Gesamtlecithin ebenso wie aceton-lösliches Lecithin, isoliert aus dem Kochsalzextrakt von fetalem Lungengewebe, zeigten zu keiner Zeit der Schwangerschaft, selbst nicht in Proben, die aus Lungengewebe erwachsener Tiere gewonnen wurden, eine Oberflächenaktivität von weniger als 15 dyn/cm.

c) Oberflächenaktiv war auch eine nicht aus der Lunge, sondern aus dem Darm und mesenterialem Fett stammende aceton-präzipitierbare Lecithin-Fraktion.
Trotzdem sei - so fügt er in einer Arbeit von 1974 (61) erläuternd hinzu - aceton-präzipitiertes Lecithin wesentlich spezifischer für die Lunge und damit verläßlicher in einer Aussage über die Lungenreife als Gesamtlecithin, das prozentual gesehen mit einem bedeutend größeren Anteil extrapulmonalen Ursprungs sei.

d) Das Verhältnis von Gesamtlecithin zu Sphingomyelin ($L_{ges.}/S$) ist größer als der Quotient aus präzipitiertem Lecithin und Sphingomyelin ($L_{präz.}/S$) und zeigt größere Schwankungen, was eine verläßliche Aussage über die fetale Lungenreife wesentlich erschwert.

e) Im Übergangsbereich mit einer L/S-Ratio von 1,5-1,8 kann bei einem Verhältnis von präzipitiertem zu Gesamtlecithin von 0,45 eine ausreichende Lungenreife angenommen werden. Gluck schreibt: "Ein hoher Prozentsatz (45 - 50 %) von aceton-präzipitiertem Material scheint dann eine rasch reifende Lunge und eine niedrige Wahrscheinlichkeit eines RDS, selbst wenn der Fet mit einer 'unreifen' L/S-Ratio geboren wird, anzukündigen."

f) Der durch die Acetonpräzipitation gewonnene Anteil des Gesamtlecithins ist ebenso oberflächenaktiv wie eine gewichtsmäßig entsprechende Menge synthetischen Dipalmitylecithins.

Coch (26) hält dagegen den Acetonpräzipitationsschritt nicht für unbedingt notwendig, da die Meßwerte nach Präzipitation nur geringfügig von denen ohne Präzipitation differieren. Darüber hinaus vermutet er sogar dadurch einen Verlust an Empfindlichkeit insofern, als die L/S-Ratio durch unterschiedliche Wiedergewinnung von DPL und Sphingomyelin verändert werden kann. Da die Sphingomyelinkonzentration als Bezugsgröße dient, sollte sie auch nicht durch - unnötige - Verarbeitungsschritte zu einer unkontrollierbaren Größe gemacht werden, die nicht mehr als verläßlicher Parameter dienen kann.
Er unterstützt jedoch die Meinung Glucks in dem Punkt, daß DPPC durch Aceton präzipitiert wird im Gegensatz zu Eigelb-Lecithin (auch als Standard erhältlich), das dem aus den Erythrocyten stammenden Lecithin entspricht und ebenfalls Aceton-löslich ist. Diese Unterschiede könnten bei der Analyse von blut-kontaminiertem Fruchtwasser von Bedeutung sein.

Verder (174) stellte als limitierenden Faktor in der Anwendung der Aceton-Präzipitation die unvollständige Wiedergewinnung von Sphingomyelin in den Vordergrund seiner Betrachtung. Er und Parkinson (136) beobachteten eine höhere L/S-Ratio nach Einbeziehung dieses Schrittes, was auf einen nicht unerheblichen Verlust von Sphingomyelin hindeutet. Weiterhin vermutet Verder eine zusätzliche Verminderung der acetonpräzipitierbaren Lecithin-Fraktion in der Acetonbehandlung durch Abspaltung der β-ständigen Fettsäure. Dabei entsteht aceton-lösliches Lyso-Lecithin.

Die Untersuchungen Jacksons (79) beziehen sich sowohl auf Methodik als auch auf Notwendigkeit dieses Schrittes. Er verglich Kühlzeiten von 5, 15 und 30 Minuten. Die Ergebnisse variierten so geringfügig, daß er eine Kühlzeit von 5 Minuten als ausreichend bewertete. (Gluck setzt in seinen Versuchen eine Kühlzeit von wenigstens 12 Stunden an. Die Resultate Jacksons, der die Meßwerte nach Kühlung von 5, 15 und 30 Minuten nebeneinanderstellt, müssen daher mit gewissem Vorbehalt betrachtet werden.)
Er zeigte, daß die L/S-Ratio ohne Acetonpräzipitation wesentlich größere Streuungen aufwies (siehe d) der Gluck'schen Ergebnisse).

Jackson kommentiert seine Ergebnisse, ohne weitere Begründungen für diese Aussage anzugeben, folgendermaßen:
Die Werte bei Auslassung der Acetonpräzipitation, die eine starke Variabilität aufweisen, scheinen mehr dem Schwangerschaftsalter als der aktuellen fetalen Lungenreife zu entsprechen.

Roux (151, 152) bezieht eine vollständig gegensätzliche Position zu Gluck. In seinen Untersuchungen besteht

a) keinerlei Korrelation zwischen $L_{präz.}$/S und dem Schwangerschaftsalter.
   Die L_{ges}/S-Ratio erscheint ihm als Parameter dafür wesentlich zuverlässiger.
b) auch keine verläßliche Beziehung zwischen $L_{präz.}$/S-Ratio und Lungenreife: von 47 Fruchtwasserproben (hauptsächlich älter als die 36. Schwangerschaftswoche) mit einer $L_{präz.}$/S-Ratio kleiner als 1,5 hatten nur zwei ein RDS und fünf respiratorische Schwierigkeiten anderer Art.
   Vier der Neugeborenen mit einer $L_{präz.}$/S-Ratio größer 2 hatten respiratorische Schwierigkeiten, jedoch nicht im Sinne eines RDS.

Daraus folgerte er, daß die $L_{präz.}$/S-R Ratio nicht als Index der fetalen Lungenreife, die L_{gesamt}/S-Ratio jedoch als Parameter des Schwangerschaftsalters mit $r = 0,4$ und $p < 0,01$ herangezogen werden darf.

Roux (152) untersuchte 1974 in einer Studie die Fettsäurezusammensetzung und Lecithin-Konzentration in der Aceton-löslichen und unlöslichen Fraktion: Er verwendete die Densitometrie sowie den visuellen Vergleich zur Bestimmung der L/S-Ratio.
Die spezifische Analyse der Fettsäuren des Lecithins erfolgte durch Veresterung bei 70° (eine Stunde lang im Wasserbad) nach Abkratzen der Lecithinbande - sichtbar gemacht mit Dichlorfluorescein (unter UV) - von der Dünnschichtplatte.
Als interner Standard diente die C_{15}-Fettsäure.
Von der Fülle seiner Ergebnisse sollen nur die, die den Acetonschritt betreffen, wiedergegeben werden.

a) "Die in Aceton präzipitierte Lecithin-Fraktion aus dem Fruchtwasser ist nicht spezifisch für den Lungen-Surfactant." Er begründete diese Meinung dadurch, daß die Ligation der fetalen Trachea den Lecithingehalt des Fruchtwassers nicht veränderte.

Die Lecithin-Konzentration des Fruchtwassers, die nach seiner Meinung in keiner Beziehung zur Schaumbildungsfähigkeit des Fruchtwassers steht, betrachtet er eher als Index der fetalen Fettablagerung und allgemeinen Membranreifung als der fetalen Lungenreife.

Er interpretiert das Lecithin im Fruchtwasser nicht als Komponente des Surfactant, sondern eher als sein Zersetzungsprodukt. Es kann jedoch auch einen Komplex verschiedener Lecithin-Fraktionen darstellen, die vielfachen und nicht lungenspezifischen Ursprungs sind.

b) Er beobachtete, daß in den beiden durch Acetonpräzipitation gewonnenen Lecithinfraktionen die Fettsäurezusammensetzung identisch ist.

Gegen Ende der Schwangerschaft erhielt er sogar höhere Werte von Palmitinsäure (C_{16}) in der Aceton-löslichen Lecithin-Fraktion.

Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der allgemein akzeptierten Meinung, daß der Aceton-präzipitierte Anteil hauptsächlich aus Dipalmityl-Lecithin besteht.

c) Weiterhin zieht er die Aussage Glucks, die ein Überwiegen des zweiten Syntheseweges des Lecithins - der Methylierung - in der Zeit zwischen der 22. und 35. Schwangerschaftswoche betrifft, in Zweifel.
Seine Werte zeigten in keiner der Fraktionen einen signifikanten Anstieg von Myristinsäure (C_{14}) zu irgendeiner Zeit der Schwangerschaft.

Dagegen wies er einen Anstieg von Palmitinsäure (C_{16}) um den Faktor 3,7 - 5,2 zwischen der 26. und 39. Schwangerschaftswoche nach.

Gluck reagierte auf die entgegengesetzten Aussagen anderer Autoren mit einigen Zugeständnissen (59, 61):

a) An der theoretischen Grundlage der Präzipitation von oberflächenaktivem Lecithin zweifelte er nach wie vor nicht. Er gestand aber zu, daß nicht das gesamte präzipitierte Lecithin oberflächenaktiv ist.

b) Er hält die Acetonpräzipitation nicht mehr für unbedingt notwendig, da die Bestimmung der L/S-Ratio per se nur semiquantitativ ist.

Gebhardt (50) untersuchte ebenfalls die Fettsäurezusammensetzung beider Lecithin-Fraktionen durch Gaschromatographie. Seine Ergebnisse widersprachen denen Roux's völlig:

a) Während der Aceton-lösliche Anteil des Lecithins hauptsächlich ungesättigte Fettsäuren enthält, ist das präzipitierte Lecithin zu 82 % mit gesättigten Fettsäuren und davon zu 76 % mit Palmitinsäure (C_{16}) substituiert. Damit unterscheiden sich beide Fraktionen signifikant.

b) Bei der Oberflächenaktivitätsmessung mit der Wilhelmy-Waage ergab sich als minimale Oberflächenspannung für den acetonlöslichen Anteil ein Wert von 15 dyn/cm und für den präzipitierten ein Wert von o-4dyn/cm.

c) Er fand, daß sich beide Fraktionen auch durch verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten auszeichnen. Der Aceton-lösliche Anteil bildet gegenüber dem präzipitierten in der Dünnschichtchromatographie die Front. Das Gesamt-Lecithin setzt sich genau aus den Banden beider Fraktionen zusammen und erscheint als einheitliche, breite Bande.

Thom (171) wiederum unterstützt die Meinung Roux's über eine prozentual gleiche Verteilung von Palmitinsäure auf beide Fraktionen. Außerdem beobachtete er die Änderungen der L/S-Ratio und des Palmitinsäuregehaltes in zentrifugiertem und unzentrifugiertem Fruchtwasser infolge der Acetonpräzipitation. Bei zentrifugiertem Fruchtwasser entstand durch die Aceton-präzipitation ein Verlust an Palmitinsäure und eine Verminderung der L/S-Ratio um je 20 %, während in der unzentrifugierten Probe der Palmitinsäuregehalt um 10 % abnahm, während die L/S-Ratio unverändert blieb.
Thom zentrifugierte bei 3000 g 10 Minuten lang.

Bei der Aceton-präzipitation ist strengstens auf die Verwendung von wasserfreiem Aceton zu achten, da sonst die Präzipitation nicht vollständig wird. Bei der Herstellung von kaltem wasserfreiem Aceton mit Calciumchlorid anhydrid sollte man daran denken, daß in der Auftrennung und Veraschung die Phosphatide als Calciumsalze vorliegen können.

3.2.6. Probenauftrag

Auch die auf die Dünnschichtplatte applizierte Menge von Probe und Standard verdient Beachtung, da sie die Diffusion und Laufstrecke des Lipids im Kieselgel beeinflußt und sich damit auf die visuelle, planimetrische oder densitometrische Auswertung auswirkt.
Das aufgetragene Volumen variiert entsprechend den Literaturangaben zwischen 1 und 100 µl. Jedoch dürfen diese Mengenangaben nicht losgelöst vom verarbeiteten Fruchtwasservolumen betrachtet werden.

Coch (26) geht in seinen Versuchen von 5 ml Fruchtwasser aus. Nach entsprechenden Vorbereitungsschritten löst er das Evaporat in 50 µl Chloroform. Dann trägt er je 5 µl von Probe und Standard auf.

Gluck (61) extrahiert 2-5 ml Fruchtwasser. Nach Zugabe von je 30 µl Chloroform zu beiden Fraktionen, die vorher zur Trockne eingedampft worden waren, appliziert er 15 µl der Proben.

Kynast (95, 96) unterscheidet in seiner Studie zwischen Semimikro- und Makro-extraktion. In der Semimikromethode verwendet er 0,25 ml Fruchtwasser, während er in der Makrotechnik 2,0 ml verarbeitet. Auf der Platte trägt er 50 µl, bzw. bei vermuteten niedrigen Lecithin-Gehalt 100 - 200 µl der Probe als Bande (nicht punktförmig) auf.

Verder (174) geht von 1-2 ml Fruchtwasser aus. Das Acetonpräzipitat nimmt er in 50 - 100 µl Chloroform auf, davon appliziert er 25 - 100 µl als 1-cm-breite Bande.

Mallikarjuneswara (107) extrahiert 10 ml Fruchtwasser.
Die Chloroformphase teilt er in vier Portionen à 5 ml, die er sofort eindampft bzw. zunächst mit Aceton präzipitiert.

Das Präzipitat löst er in 10 µl Chloroform, die er vollständig aufträgt. Der Lecithingehalt eines Fleckes entspricht also der Menge in 2,5 ml Fruchtwasser. Der Durchmesser des Auftragsflecks durfte dabei maximal eine Größe von 4 mm haben.

Es steht außer Zweifel, daß sich das Lauf- und Trennverhalten mit steigender Konzentration ändern, was sich bei der visuellen, wie planimetrischen wie densitometrischen Auswertung bemerkbar macht.

3.2.7. Entwicklung im Fließmittel

Unterschiede bestehen in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung des Fließmittels. Tabelle V gibt einen Überblick über die am häufigsten verwendeten Laufmittel:

Tabelle V Übersicht über die Zusammensetzung von Fließmitteln

$CHCl_3$	CH_3OH	H_2O	
13	8	0,5	Borer (11), Gluck (59)
65	25	4	Gluck (61), Olson (132), Jackson (79), Kynast (95,96), Mallikarjuneswara (107), Schirar (157)
95	34	4	Gluck (60), Marrison (115, 116)
13	5	0,8	Spellacy (167)

$CHCl_3$	CH_3OH	NH_4OH (ohne Konzentrationsangabe)	
170	20	3	Coch (26)
200	25	4	Singh (163)
75	30	4,5(25%ig)	Bhagwanani (8)
65	30	4	Verhoeven (175)
70	30	5	Verder (174)

$CHCl_3$	CH_3OH	CH_5OH/H_2O	
65	20	5 : 4	Parkinson (136)

CH_2Cl_2	C_2H_5OH	H_2O	
102	24	3	Blass (9)

$CHCl_3$	CH_3OH	Eisessig	H_2O	
58	29	9	4	Roux (152)

In den meisten Versuchsbeschreibungen wurden keine genaueren Angaben über Temperatur und Luftfeuchtigkeit gemacht, die das Ergebnis beeinflussen können. Die Entwicklungsdauer betrug durchschnittlich 1,5 - 2 Stunden. Dabei erreichte die Lösungsmittelfront eine Höhe von 12-15 cm.

Bei einigen Autoren sind kürzere Entwicklungszeiten durch Verwendung anderer Platten möglich. (Blass (9), Morrison (115, 116) Singh (163))

3.2.8. Verwendung von Standards

Auch die Wahl der Standards variiert bei den einzelnen Autoren. Der Hauptunterschied betrifft das Lecithin. Dabei werden meistens reines Dipalmityl-Lecithin oder Lecithin aus Eigelb verwendet.
Coch (26) stellt beim Vergleich von reinem Dipalmityllecithin (von General Biochemicals) mit Eigelb-Lecithin fest, daß dieses sowohl in der Wismuth-Färbung wie auch in der Verkohlung nach Schwefelsäurebehandlung dunklere Flecken ergibt als Dipalmityl-Lecithin. In dem Supelco-Standard-Kit verhielten sich beide Lecithin-Standards identisch.

Verder (174), Morrison (115), Verhoeven (175), Gebhardt (49, 50) verwendeten Standards von Sigma; dabei stammt das Lecithin aus dem Eigelb. Teilweise verglichen sie diese Standards mit denen anderer Firmen, wie z.B. Verhoeven (175) und Gebhardt (49, 50), die beide zusätzlich Standards von Koch bezogen. Im Vergleich beider Serien zeigte Gebhardt, daß nur synthetisches Dipalmityl-Lecithin mit 99 %iger Reinheit als Bezugsstandard in Frage kommt, da nur dieses dem Aceton-präzipitierten Lecithin entspricht. Das Lecithin aus dem Eigelb ist der Aceton-löslichen Fraktion, die in der Chromatographie schneller wandert, gleichzusetzen.

3.2.9. Färbung und Veraschung

Bei der Sichtbarmachung der Flecke zur quantitativen Auswertung kommt wiederum eine Fülle widersprüchlicher Meinungen und Empfehlungen zum Ausdruck.

Die wohl am häufigsten angewandte (und auch von Egge (39) durchgeführte) Färbetechnik ist das Besprühen mit Schwefelsäure mit anschließendem Veraschen. Bereits in der Konzentration der verwendeten H_2SO_4 zeigten sich Unterschiede. Während Gluck (58) und Olson (134) 50 %ige Schwefelsäure verwendeten, gebrauchten Egge u.a. die Säure in 10 %iger Verdünnung. Höher konzentrierte Säure birgt die Gefahr einer verstärkten Oxidation nicht zu elementarem Kohlenstoff, sondern zu flüchtigem CO oder CO_2 mit der Konsequenz, daß der Schwärzungsgrad nach Veraschung zu niedrig liegt und nicht mehr der Substratkonzentration entspricht.

Bei dieser Technik, bei der auf gleichmäßiges Sprühen mit einem feinen Nebel zu achten ist, können keine kommerziellen Dünnschichtplatten, die gewöhnlich zur besseren Haltbarmachung der Schicht einen organischen Binder enthalten, verwendet werden. Bei selbst hergestellten Platten müssen eine ungleichmäßigere Schichtdicke und leichtere Verletzbarkeit der Oberfläche in Kauf genommen werden. Diese kann sich vor allem beim Besprühen nachteilig bemerkbar machen.

Althaus und Neuhoff (4) schlugen zur Stabilisierung der Kieselgel-schicht die Verwendung von Wasserglas (Natrium-silikat) oder Gips (Calciumsulfat) vor.

Ein weiteres Problem der kommerziellen Platten besteht in ihrer Neigung zu zerspringen, wenn sie beim Veraschen auf eine Heizplatte von 100 bis 200° C gelegt werden.

Unter Verwendung selbst hergestellter Platten ist der Grad der bei der Behandlung mit Schwefelsäure auftretenden Schwärzung bei gleicher Lipidmenge abhängig von der Struktur des jeweiligen Lipids.
Lipide mit kurzkettigen oder gesättigten Fettsäuren ergeben bei gleicher Menge eine geringere Schwärzung als solche mit hochungesättigten Fettsäuren. Zur Korrektur ist es ratsam, experi-

mentell ermittelte Schwärzungsfaktoren zu berücksichtigen, die dann, mit den jeweiligen Flächenprodukten multipliziert, den prozentualen Anteil dieser Lipidkomponente ergeben. (39) Als Beispiel seien das Cholesterin mit einem Korrekturfaktor von 1,00 und die Phospholipide von 1,55 genannt. (Diese Werte gelten für Serumlipide).
Coch (26) bemerkte bei den Phospholipiden ebenfalls verschiedene Schwärzungsgrade. Er fand, daß Sphingomyelin und Eigelb-Lecithin bei gleichen Konzentrationen dunkler veraschen als Dipalmityl-Lecithin.

Verhoeven (175) zeigte, daß einem eingewogenen Verhältnis Lecithin zu Sphingomyelin von 2:1 eine densitometrische L/S-Ratio nach Veraschen von 1,3 entspricht. Er beobachtete jedoch keinen Unterschied in Farbe oder Farbintensität zwischen Eigelb-Lecithin und DPPC. Das Eigelb-Lecithin zeichnete sich lediglich durch eine geringfügig schnellere Wanderungsgeschwindigkeit aus.

Olson (132) verglich verschiedene Veraschungsmethoden. Neben 50 %iger Schwefelsäure verwendete er Kaliumdichromat (einprozentig), in 70 %iger Schwefelsäure gelöst (158), und außerdem 5 %iges Ammoniumsulfat.
Die beiden ersten Spray-Reagenzien führten bei entsprechend hohen Temperaturen (280°) zu Farbintensitäten, die präzise die Anzahl der Kohlenstoff-Atome in Lecithin und Sphingomyelin widerspiegelten. Die Kalium-dichromat-Schwefelsäure-Lösung schien dabei gegenüber der ersten noch geringe Vorteile zu besitzen.
Die dritte Technik, die Olson (132) untersuchte, wurde bereits von Gluck (61) 1974 angewendet. Zur Vermeidung der Fehlerquellen durch das Besprühen wird ein 30 %iger Kieselgelbrei mit 5 % Ammoniumsulfat hergestellt. Beim Veraschen ergibt sich jedoch eine stark verminderte Farbintensität der Lecithinflecken bei unveränderten Sphingemyelinflecken. Die Ursache mag darin liegen, daß in der Zeit, die zusätzlich benötigt wird, um Ammoniak zu verflüchtigen, bevor der Schwefelsäurerest die organischen Anteile der Verbindung in Kohlenstoff umwandeln kann, die Fettsäuren bereits teilweise hydrolysiert

und verdampft sind. Die Esterbindung der Fettsäuren scheint beim Lecithin weniger stabil zu sein als beim Sphingomyelin, was das unterschiedliche Verhalten bei der Veraschung erklären könnte.
Gluck (61) gibt als Referenzwert für die Lungenreife eine densitometrisch ermittelte L/S-Ratio auf mit Ammoniumsulfat hergestellten Platten von 2,0 an, die einer gravimetrisch bestimmten L/S-Ratio der gleichen Probe von 4,0 entspricht. Trotz der Modifikation der Veraschungsbedingungen (Ammoniumsulfat statt Schwefelsäure) änderte er seinen Referenzwert nicht. Aufgrund der Aussagen anderer Autoren und seiner eigenen Vergleiche densitometrischer Werte mit gravimetrischen Meßdaten steht jedoch außer Zweifel, daß bei der Ammoniumsulfat-methode eine wesentlich höhere Lecithin-Konzentration vorliegen muß, um eine L/S-Ratio von 2 zu erreichen als bei der Schwefelsäure-Veraschung.

Weitere häufig verwendete Färbereagenzien sind:

1. Bromthymolblau (Blau (10), Olson (132), Verhoeven (175), Gluck (61))
2. Phosphormolybdansäure (Giridhar (55), Verhoeven (175), Olson (132), Lobstein (102), Badham (6), Coch (26), Morrison (114, 115))
3. Ioddämpfe (Coch (26), Kynast (95, 96)
4. Wismuthsubnitrat (Coch (26), Verhoeven (175), Singh (163))
5. Rhodamin B (Blass (9), Schiefer/Neuhoff (129), Althaus/Neuhoff (4))
6. Dichlorfluorescein in Isopropanol (1g/l) Lobstein (102)

Der Nachteil der Färbereagenzien 1-4 besteht bei allen gemeinsam im Verblassen der Flecken innerhalb weniger Stunden. Zum Teil kommt eine Hintergrundanfärbung als störender Faktor hinzu. Bei den Methoden 1, 3 und 4 beobachtete Verhoeven (175) zusätzlich verschiedene Anfärbung der Lecithine unterschiedlicher Quellen und eine erhebliche Variation der Fleckengröße und Farbintensität mit der Luftfeuchtigkeit. Damit bewertete er diese Färbereagenzien als nicht geeignet für die Densito-

metrie. Phosphormolybdansäure färbt nur reduzierende Substanzen an und kann darum nicht als Indikator für Dipalmitylecithin dienen. Es ist daher nur in Kombination mit anderen Färbungen von Nutzen.
Außerdem ist bei den Farbreagenzien 1, 2 und 3 die Farbintensität der Sphingomyelin- und Lecithinflecken unterschiedlich stark. Nach Gebhardt (50) entspricht einer $L/S_{gravimetr.}$ von 1,8 eine $L/S_{densitometr.}$ von 1,2.

Es gab verschiedene Versuche, die einzelnen Nachteile zu eliminieren. Blau (10) beschreibt beispielsweise eine Methode zur Stabilisierung der Bromthymolblaufärbung. Dazu verwendete er 10 %iges Triäthanolamin in Aceton.

Morrison (114) bemühte sich um eine Entfernung der Hintergrundfärbung (mit kaltem Aceton), die nach Behandlung mit Phosphormolybdansäure entstand.
Singh (163) verwendete zur Entfärbung des Hintergrundes bei Wismuthsubnitratfärbung 20 %igen Eisessig.

Trotz aller Versuche zur Optimierung der Anfärbung fehlt es diesen Färbreagenzien an densitometrischer Präzision. Nicht zuletzt darum dienten sie fast ausschließlich der planimetrischen Bestimmung und der Auswertung durch visuellen Vergleich.

2,7 Dichlorfluorescein (102), das theoretisch mit der Fluoreszenz-Quenching-Methode ausgewertet werden könnte, findet in der Studie von Lobstein nur Anwendung für den visuellen Flekkenvergleich.

Die Rhodamin B bzw. G Technik in Verbindung mit der direkten Fluoreszenzmessung ist die Methode der Wahl in der zweidimensionalen Chromatographie und zeichnet sich durch besondere Vorteile in der Mikrobestimmung von zellulären Phospholipiden aus. (129, 4) Ihre Durchführung ist jedoch an eine relativ aufwendige Apparatur gebunden.

3.2.10. Quantitative Auswertung

a) Die einfachste Auswertung ist der visuelle Vergleich von Intensität und Größe der Flecken der Probe und des Standards. (Coch 26) Roux verfeinert diese grobe Quantifizierung, indem er den Mittelwert der Ergebnisse dreier Beobachter bestimmt. (151)

b) Eine etwas reproduzierbarere Auswertungstechnik stellt die Planimetrie dar, die auf verschiedene Weisen durchgeführt wird.
Coch (26) überprüft seine Ergebnisse aus dem visuellen Vergleich durch Berechnung der Fleckengröße mithilfe eines Gitters ("grid"). Er bezeichnet diese Methode als semiquantitativ.
Einige Autoren messen die Breite und Länge der Flecken, die sie durch verschiedene Farbreagenzien sichtbar gemacht haben.
Die L/S-Ratio ergibt sich dabei aus dem Quotient der Flächenprodukte. (41, 16, 28)
Eine weitere Möglichkeit besteht in der Flächenintegration nach Messung des Fleckumfangs.
Bei dieser Technik bleiben sowohl Farbintensität wie auch unterschiedliche Diffusion und Wanderungsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von Schichtdicke, Fließmittel, Temperatur, Feuchtigkeit, aufgetragener Probenmenge unberücksichtigt. Auch die Bestimmung der Fleck-Umrisse scheint nicht ganz unproblematisch zu sein, da die Begrenzung der Flecken mit steigenden Wanderungsstrecken an Trennschärfe abnimmt. Kleine Abweichungen können sich im Endergebnis gravierend auswirken.

c) Als gebräuchlichste Methode ist die Densitometrie zu nennen. Die quantitative Auswertung durch direktes photometrisches Abtasten der Chromatogramme kann seit 1967 mit kommerziellen Geräten durchgeführt werden.

Im folgenden werden die physikalischen Grundlagen der Densitometrie kurz dargestellt (154):
In der Densitometrie bestehen die Möglichkeiten der Remissions- und Transmissions-, der "Fluorescence-Quenching" und der Fluor-

eszenzmessung. Der Wellenlängenbereich erstreckt sich von 185 - 2500 nm.
Die Reproduzierbarkeit liegt führ mehrere Flecken in der Routine bei 1 - 3 %. Die quantitativen Nachweisgrenzen betragen für die Remission ca. 10^{-9} - 10^{-7}g, für die Fluoreszenz 10^{-11} - 10^{-9}g.

a) Bei der Transmissionsmessung farbiger Dünnschichtchromatographie (DC-)flecken wird der Fleck durch einen entsprechend breiten Spalt abgetastet. Die Flächen zwischen Absorptions-Orts-Kurve und Basislinie wird als Maß für die Konzentration verwendet. Das Lambert-Beer'sche Gesetz gilt dabei jedoch nicht, da die Sorbensschicht das Meßlicht stark streut.

b) Bei der Remission wird das Licht auf den fleckfreien Plattenuntergrund diffus gestreut, wogegen der Fleck einen Teil des auffallenden Meßlichtes absorbiert, was sich quantitativ auswerten läßt.
Der unbestrittene Vorteil der Remissions- gegenüber der Transmissionsmessung an DC-Platten besteht darin, daß
1) die Remissionsmessung ohne Einschränkung bei jeder interessierenden Wellenlänge von 196 nm bis 2500 nm möglich ist.
2) nur eine dünne Oberflächenschicht erfaßt wird, wodurch Schichtdickenschwankungen die Basislinie wesentlich weniger beeinflussen.
Die Empfindlichkeitsverminderung bei Remissionsmessung um den Faktor 2 erweist sich als bedeutungslos, wenn man das Verhältnis von Signalhöhe zu Untergrundschwankung betrachtet.

Der quantitative Zusammenhang zwischen Remissionsgrad R und Konzentration c wird durch die Kubelka-Munk-Formel $(1-R)^2$ R=E x c/s beschrieben, wobei E den Absorptions- und s den Streukoeffizienten darstellen.
In der Praxis tastet man die Chromatogramme spaltförmig ab und wertet über die Fläche zwischen der relativen Remissions-Orts-Kurve und der Basislinie quantitativ aus. Dadurch erhält man eine leicht gekrümmte Eichkurve, die durch den Nullpunkt geht und im unteren Bereich eine Gerade ist.

Der obere gekrümmte Eichkurvenast kann in vielen Fällen durch eine parabolische (F^2 = fkt. (C)) oder durch eine zweifach logarithmische Approximation (log.F = fkt. (log.c)) begradigt werden.

Die Nachweisgrenze absorptionsphotometrischer Messungen wird bei entsprechender Elektronik nicht durch das Geräterauschen, sondern durch die Inhomogenitäten innerhalb der Sorbensschicht bestimmt. Im langwelligen sichtbaren Spektralbereich wird die Meßstrahlung nicht mehr so stark gestreut und dringt deswegen in die Schicht ein. Aus diesem Grund machen sich in diesem Spektralbereich Schichtdickenunterschiede in Form von Basislinienschwankungen bemerkbar.

c) Die Remissionsmessung ist ohne weiteres auch auf UV-absorbierende DC-flecken anwendbar, indem man dem Sorbens möglichst homogen einen Fluoreszenzindikator beimengt, der, bei kurzen Wellenlängen angeregt, meist grün fluoresziert. Dieses Fluoreszenz-Quenching-Verfahren hat sich zur visuellen Sichtbarmachung UV-absorbierender DC-flecken ausgezeichnet bewährt, photometrisch bringt es jedoch gegenüber der Remissionsmessung Nachteile.
   1) Es treten starke Untergrundschwankungen auf, die auf der unvermeidbaren Inhomogenität der Indikatorverteilung im Sorbens beruhen.
   2) Die Absorption der Substanzen muß im Bereich des Anregungssystems des Indikators liegen. Je mehr die Wellenlänge des Absorptionsmaximumsder Substanz von der des Anregungsmaximums des Indikators differiert, desto größere elektronische Verstärkungen müssen gewählt werden, was dann zu schlechteren Nachweisgrenzen führt.

d) Demgegenüber bietet die Eigenfluoreszenzmessung von DC-Flecken hinsichtlich Maßempfindlichkeit und Linearität wesentliche Vorteile. Zwischen Fluoreszenzintensität I_{FI} und der Fleckkonzentration c besteht ein exponentieller Zusammenhang:

$$I_{FI} \sim I_{0\lambda} \times (1-10^{-E\,\lambda\, c})$$

(E_λ = Absorptionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge,
$I_{0\lambda}$ = Lichtintensität bei der anregenden Wellenlänge)

Am Beispiel von Rhodamin B, das von mehren Autoren als Farbreagenz verwendet wird (16, 4,15), wird diese aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz ableitbare Formel bestätigt. Für kleine Extinktionen E_λ c gilt die lineare Näherung: $I_{FI} \sim I_{0\lambda} \times E_\lambda \times c$, die die Grundformel der quantitativen Fluorometrie darstellt.

Der Arbeitsbereich für fluorimetrische DC-Untersuchungen liegt bei ca. 0,1 - 500 ng Substanzmenge/Fleck, wobei sich der Linearitätsbereich meistens über 2 Zehnerpotenzen erstreckt. Die Nachweisgrenzen liegen bei 10^{-11} - 10^{-9}g.

Um möglichst hohe Meßempfindlichkeiten zu erreichen, sollte der Proportionalitätsfaktor $I_{0\lambda} \times E_\lambda$ möglichst groß sein.

Der lineare Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Substanzmenge im verwendeten Konzentrationsbereich bringt es mit sich, daß der Meßwert unabhängig von der Fleckform ist. Dadurch wird die direkte Fluorimetrie, die Methode der Wahl bei quantitativen Auswertungen an zweidimensionalen Chromatogrammen, da die zweidimensional getrennte Probe mit eindimensional getrenntem Standard verglichen werden kann.

Gegenüber dem Auskratzen der DC-Flecken mit anschließender Eluation und Photometrie der Lösung (wie sie auch von einigen Autoren durchgeführt wurde) bietet die photometrische Direktauswertung der Chromatogramme folgende Vorteile: (siehe auch Tabelle VI)

Tabelle VI Übersicht über verschiedene Methoden der Auswertung

	Reproduzierbarkeit	Substanzbedarf	Zeitaufwand pro Probe und Analyse für die Auswertung bei 4 St./Platte
- visueller Vergleich	10-30 %	1-10 µg	ca. 0,1 Min.
- Eluation	2-5 %	10-100 µg	20 Min.
photometr. Direktauswertung			
- Absorption	1,5-2,5 %	0,1-10 µg	< 2 Min.
- Fluoreszenz	1-2 %	0,0001-0,1 µg	< 2 Min.

1) Infolge höherer Meßempfindlichkeit wird nur weniger Substanzmenge/Fleck benötigt und eine bessere chromatographische Trennung erzielt.
2) Es entstehen keine systematischen Fehler bei Chromatogrammen mit überlappenden Flecken
3) Die Messung kann sofort nach Trennung erfolgen. Neben dem reinen Zeitgewinn ist dadurch die Gefahr der Veränderung licht- und sauerstoffempfindlicher Substanzen vermindert.

4. Eigene Untersuchungen

Die wichtigsten der Arbeitsschritte, die in der Literatur besonders kontrovers erscheinen, wurden in eigenen Versuchen überprüft.
Dies geschah mit der nachfolgend beschriebenen Arbeitstechnik, die nach mehreren Vorversuchen als Standardarbeitstechnik festgelegt wurde. Eventuelle Abweichungen sind bei der Beschreibung der einzelnen Versuche angegeben.

4.1. Standardarbeitstechnik

Geräte:

1. Laborzentrifuge "Hettich Rotixa K"
2. Vortex-Mixer
3. Magnet-Rührer
4. Abdampfeinrichtung durch Stickstoff
5. Wasserbad
6. Heizplatte mit 100° und 200°
7. Camag Elektrophorese-Scanner mit Integrator
8. Beckman 10''-Recorder

Reagenzien:

1. Kieselgel (Camag D-O)
2. Chloroform, Methanol, Aceton (reinst, wasserfrei)
3. Ammoniumhydroxid-Lösung 25 %ig
4. Schwefelsäure 10 %ig
5. Sigma-Standard:
   DL-α- Phosphatidyl Choline Dipalmitoyl
   Grade I No. P - 6138
   Sphingomyelin from Bovine Brain
   Type I No. S - 7004

Material:

1. Polypropylenröhrchen
2. Polypropylenröhrchen konisch 14 x 95 mm
3. Chromatographietanks rund 50 x 70 mm mit Schliffdeckel 50 x 12 mm
4. Pasteurpipetten
5. Objektträger 25 x 75 mm

6. Meßpipetten
7. Capilletor (Labora Mannheim)
8. Desaga Spezialzerstäuber aus Glas zum Aufnebeln von Reagenzien (Desaga - Nr. 124000)

Vorbereitende Arbeiten

1) Waschen des Kieselgels

a) 200 g Kieselgel mit 200 ml H_2O verrühren, zentrifugieren, Überstand abgießen
b) 200 ml Methanol zugeben, mischen, zentrifugieren, Überstand abgießen
c) wie b)
d) 200 ml Methanol/Chloroform Gemisch (1:1, v:v) zugeben, mischen, zentrifugieren, Überstand abgießen
e) wie d)
f) 200 ml Chloroform zugeben, mischen, zentrifugieren, Überstand abgießen
g) wie f)
h) Kieselgel auf Filterpapier trocknen

2) Herstellung der DC-Platten

200 g Kieselgel mit etwa 200 ml Chloroform in einem dicht schließenden Glas auf dem Magnetrührer vermischen, bis eine homogene Suspension entstanden ist (mehrere Stunden). Je 2 Objektträger werden Rücken an Rücken in die Suspension eingetaucht und sofort wieder herausgezogen. Man läßt die Objektträger an der Luft trocknen. Die Ränder werden mit dem Fingernagel etwa 1 mm breit von der Beschichtung befreit. Brechen kleine Schollen heraus, so ist die Kieselgelschicht zu dick; die Beschichtung muß mit einer dünneren Suspension wiederholt werden. Scheint das Glas durch die Kieselgelschicht durch, so ist diese zu dünn; die Beschichtung muß mit einer dickeren Suspension wiederholt werden.

3) Herstellen des Standards

10 mg Lecithin-Standard werden in 10 ml Chloroform gelöst, die Lösung ist im Kühlschrank bei +4° mehrere Wochen haltbar. 10 mg Sphingomyelin-Standard in 10 ml Chloroform lösen, die Lösung ist ebenfalls im Kühlschrank mehrere Wochen haltbar.

Für jede Analysenreihe werden frisch hergestellt: Mischungen von L:S wie 1:1, 2:1, 3:1, 4:1.

4) Herstellen des Laufmittels

65 ml Chloroform werden mit 30 ml Methanol und 4 ml Ammoniumhydroxid gemischt. In gut verschlossenen Flaschen ist die Lösung im Kühlschrank mindestens eine Woche haltbar.

Arbeitsanleitung

1. Frisches Fruchtwasser sofort nach Gewinnung bei ca. 4000 U/min (= 3000g) 5 Min. lang zentrifugieren
2. 1,5 ml des Überstandes in ein Reagenzglas aus Polypropylen pipettieren
3. 4,5 ml eines $CHCl_3/CH_3OH$-Gemisches (2:1, v:v) zusetzen
4. 1 Min. lang auf dem Vortex-Mischer mischen
5. Bei ca. 4000 U/min. (= 3000 g) 5 Min. lang zentrifugieren
6. Chloroformphase vorsichtig mit Pasteurpipette abziehen, dabei möglichst Verunreinigungen durch Protein aus der Grenzschicht vermeiden
7. 2 ml des Chloroform-Extraktes in ein konisches Reagenzglas aus Polypropylen pipettieren und unter Stickstoff zur Trockne eindampfen
8. Je nach Schwangerschaftswoche 10 - 70 µl Chloroform zufügen und auf dem Vortex-Mischer rütteln
9. Chromatographietanks mit 1,5 ml Laufmittel füllen und nach Füllung 5 Min. lang offen stehen lassen
10. 1 µl der Probe und eines Standards 5-7 mm vom unteren Rand entfernt punktförmig auftragen; durch fraktioniertes Auftragen den Fleck möglichst klein halten
11. Je 3 Plättchen im verschlossenen Tank entwickeln; die Plat-

ten dürfen sich nicht berühren
Laufzeit: 10 Min. Laufstrecke: ca. 5 cm

12. Plättchen an der Luft 5 - 10 Min. lang trocknen lassen
13. Unter dem Abzug mit 10 %iger Schwefelsäure besprühen
14. Bei 100° auf der Heizplatte 2 - 3 Min. trocknen lassen
15. Plättchen auf die 200° heiße Platte legen und veraschen, bis die Rauchentwicklung beendet ist (ca. 30 sec.)
16. Auswertung
Arbeitszeit: ca. 1 Std.

4.2. Versuche zur Sprühtechnik

Da - wie mehrfach in der Literatur bestätigt - (... "the L/S ratio responds almost identically to the planimetric procedure of Borer and co-workers, on which ist mainly was based. It also is linear up to an L/S-ratio of 3, but there is much scattering and non-linearity at higher ratios". Gluck (61), ebenso 175, 149, 159, 151, 50) bei der Verwendung von Farbstoffen eine stöchiometrische Anfärbung der Phospholipide fraglich und die entstehende Färbung teilweise nicht stabil ist (10, 95), entschieden wir uns in der Frage der Visualisierung der getrennten Phospholipide für die Veraschungstechnik, die auch in der allgemeinen Lipidchemie vielfach mit guten Erfahrungen Verwendung findet.

Zunächst wurde versucht, das Ansprühen der DC-Platten mit einem Schwefelsäurenebel zu standardisieren. Das Besprühen mit 10 %iger H_2SO_4 wurde mit dem Spray-Gun der Fa. Desaga durchgeführt. (Desaga-Spray-Gun mit Treibgas und Vorratsflasche, Bestell-Nr. 124010)

Es zeigte sich jedoch, daß der Sprühnebel in der Tröpfchengröße und -verteilung innerhalb des Sprühkegels sehr ungleichmäßig ist, was sich - je mehr der Druck gegen Ende der Flasche nachläßt - immer stärker bemerkbar macht.
Auf den selbst hergestellten Chromatographieplatten sitzt die Kieselgelschicht wegen des fehlenden Bindemittels nur sehr locker. Beim Aufsprühen der Schwefelsäure werden besonders durch größere Tropfen Kieselgelpartikel aus der Oberfläche herausgeschlagen, so daß eine unerwünschte körnige Struktur

entsteht, die sich in der densitometrischen Auswertung nachteilig auswirkt. Die Modifikationen, die zur Verbesserung der Technik durchgeführt wurden, brachten keine wesentlich günstigeren Ergebnisse:

Bei Steilstellung der Platten während des Sprühvorganges auf einen Winkel von 70° wird die Kieselgelschicht durch den fast rechtwinklig auftreffenden Strahl in kürzester Zeit durchnäßt; dies bringt die Gefahr des Verlaufens mit sich. Mehrfach wurde beobachtet, daß wegen des inhomogenen Sprühkegels die Schicht nicht überall gleichmäßig befeuchtet werden konnte, so daß ein Teil der Fläche noch annähernd trocken war, während ein anderer bereits durch die Nässe transparent erschien. Ein Verlaufen der Schicht an zu stark durchfeuchteten Stellen führt zu verminderter Trennschärfe der chromatographierten Lipide und zu einer Veränderung der Schichtdicke und Oberflächenstruktur; jeder dieser Faktoren hat einen Einfluß auf die Densitometrie.

Eine geringere Plättchenneigung (30°) führt zu stärkerer Grobporigkeit der Oberfläche, da man die Schicht längere Zeit bis zu einer einheitlichen Befeuchtung besprühen muß und jeder Tropfen eine größere Fläche des Plättchens bedeckt.

Druckänderungen, die bei Verwendung des "Spray-Gun" nur durch Abstandsänderungen erreicht werden können und daher durch die Größe des Abzuges limitiert sind, bringen ebenfalls keine Vorteile mit sich.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß mithilfe des "Spray-Gun" keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden konnten.

Es wurde daher bei den weiteren Versuchen ein Glassprühkolben verwendet, der an eine Preßluftflasche geschlossen wurde. Durch Regelung des Druckes läßt sich ein feiner Sprühnebel erzeugen und auch reproduzierbar einstellen, der die Kieselgeloberfläche kaum verletzt und gleichmäßig befeuchtet.

Folgende Arbeitstechnik erwies sich als optimal:

Neigung der Plättchen in einem Winkel von 70°
Sprühentfernung 30 cm
Sprühdauer 2-4 sec.

Sobald die Schicht transparent erscheint (dieser Prozeß geht von den Rändern aus), legt man die Platten flach auf ein Filterpapier.

Nach Trocknung der Plättchen auf einer Heizplatte bei 100° (ca. 2 Min.), werden sie bei 200° verascht (ca. 30 sec.; die Veraschung ist vollständig, wenn die Rauchentwicklung der Platten aufhört.) Das Trocknen und Veraschen müssen im Abzug durchgeführt werden.

4.3. Verwendung von Ammoniumsulfat ($(NH_4)_2SO_4$)

Gluck (61) erwähnt als Alternative zum Besprühen mit H_2SO_4 die Herstellung von Kieselgel unter Verwendung von 5 %iger $(NH_4)_2SO_4$-Lösung. Bei dieser Kieselgelzusammensetzung ist jedoch die Herstellung der Platten durch Eintauchen nicht möglich, da man durch Eintauchen der Objektträger in eine wäßrige Kieselgellösung keine gleichmäßige Schicht erzeugen kann.

Ein Zusatz von Ammoniumsulfat zur Kieselgel-Chloroform-Suspension führt jedoch nicht zu einem homogenen Gemisch.

Als weitere Alternative bot sich die aufsteigende Chromatographie in H_2SO_4 oder $(NH_4)_2SO_4$ im Anschluß an die eigentliche Entwicklung im Laufmittel an. Diese Technik zeichnet sich durch den Vorteil geringerer Oberflächenverletzung aus. Es ist darauf zu achten, daß die organischen Lösungsmittel vollständig verdunstet sind, bevor der 2. Chromatographiegang in Schwefelsäure oder Ammoniumsulfat durchgeführt wird.

Bei einem Vergleich von Plättchen, die mit H_2SO_4 entwickelt bzw. besprüht worden waren, zeigte sich, daß die zusätzliche Chromatographie eine verminderte Trennschärfe der Lipidflekken zur Folge hatte.
Entsprechend waren die Peaks, die der Schreiber während der densitometrischen Auswertung aufzeichnete, in ihrer Basis verbreitert, und sie erreichten nicht die Nullinie.

Abb. 1 Auftrennung der Lipidflecken nach Entwicklung bzw. Besprühen mit H_2SO_4

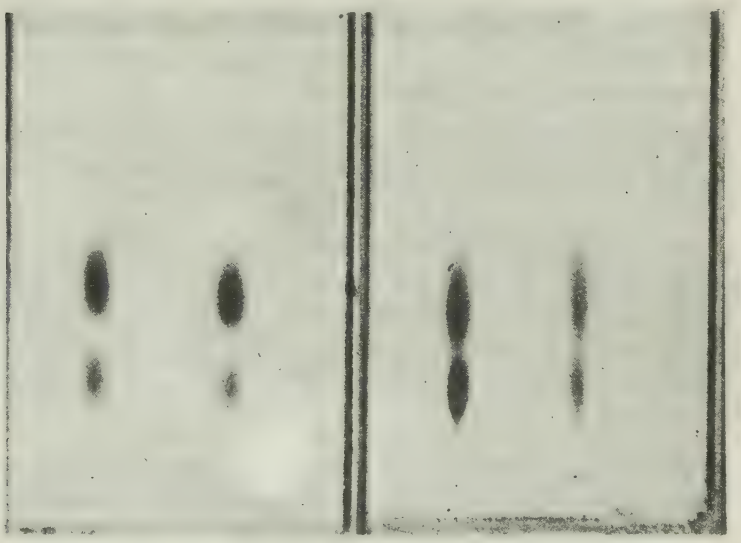
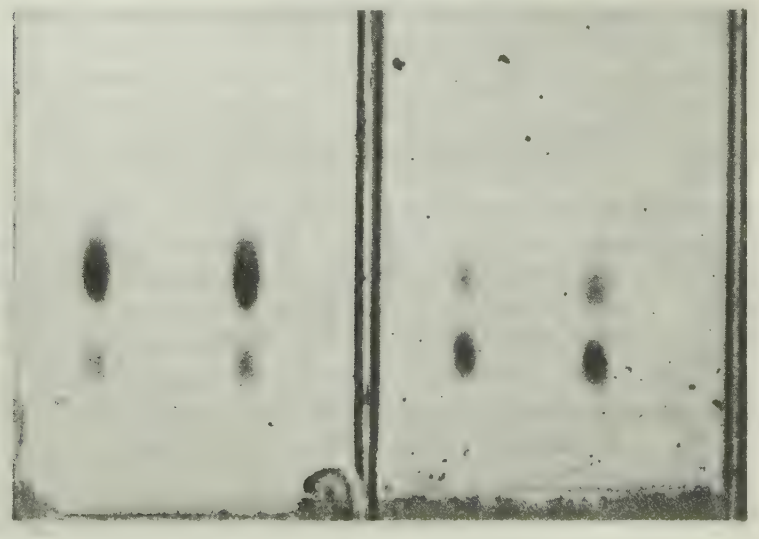


Abb. 2 Farbintensitätsunterschiede der Lipidflecken nach Besprühen mit H_2SO_4 (linkes Bild) bzw. Entwicklung in 5 %igem $(NH_4)_2SO_4$



Entwickelt man die Platten stattdessen in Ammoniumsulfat (5 %ig), so macht sich gegenüber den mit H_2SO_4 besprühten Platten eine veränderte Anfärbung einzelner Lipide bemerkbar. Die Farbintensität des Lecithinflecks war signifikant vermindert, während die der Sphingomyelinflecken in beiden Techniken übereinstimmte. (s. Abb. 2)

Dadurch änderte sich bei der densitometrischen Auswertung das Verhältnis der Fleckenintensitäten zueinander ganz entscheidend.

Eine Steigerung der $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration auf 10, 20 und 30 % beeinflußte die Meßwerte nur geringfügig. Jedoch ließ sich bei gleichem Mischungsverhältnis der Standards parallel zu den Konzentrationserhöhungen der $(NH_4)_2SO_4$-Lösung ein leichter Anstieg des Quotienten aus den Intensitätsmeßwerten beobachten.

Tabelle VII Einfluß der Konzentrationserhöhung von $(NH_4)_2SO_4$ auf das Verhältnis der Fleckenintensitäten von Lecithin

Standard	10 %		20 %		30 %	
3:1	0,59/0,54	0,56	0,59/0,59/0,60	0,59	0,65/0,67/0,71	0,68
	0,56/0,58	0,57	0,59/0,61	0,60	0,71/0,72/0,67	0,70
			0,63/0,58	0,61		
4:1	0,70/0,71/0,74	0,72			0,93/0,90/0,88	0,90
	0,88/0,92/0,88	0,89			0,87/0,90/0,87	0,89
	0,76/0,78	0,77				

Von verschiedenen Autoren wurde bereits auf die starke Diskrepanz zwischen dem Verhältnis der gemessenen Remissionswerte und der eingewogenen Lipidmengen des Standards bei der Anfärbung mit Ammoniumsulfat hingewiesen. "An L/S-ratio of 2,0 with reflectance densitometry - unter Verwendung von Platten, die mit Ammoniumsulfat hergestellt wurden (Anm. des Verfassers) - for example is equivalent to an L/S-ratio of 4,0 with gravimetric techniques." Gluck (61)

"In a more recent paper Gluck and Kulovich (60) come to the surprising conclusion, that: "Densitometric ratios are significantly more reliable and far less variable than concentration ratios. At maturity an L/S-ratio of 2:1 by density comparison actually reflects a ratio of concentrations around 4:1." (49) "It is seen that the $(L/S)_D$ transition point of 1,2 is equivalent to an $(L/S)_P$ of approximately 1,8. ($(L/S)_D$ entspricht der densitometrisch ermittelten L/S Ratio, $(L/S)_P$ der gravimetrisch gemessenen - Anm. des Verfassers)(49)

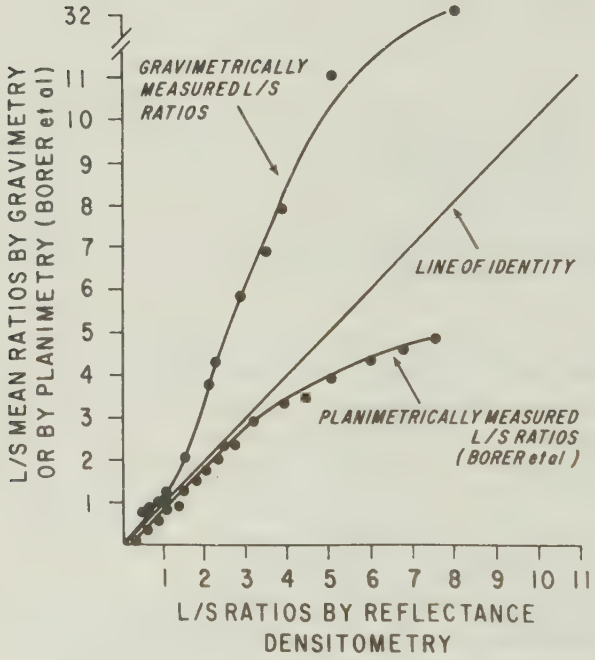
"During this period Gluck and Kulovich had switched to ammonium sulfate charring, and with this method their interpretation was unchanged:" ... (L/S ratio... 2,0 or greater... Mature...No RDS on delivery".)

... In contrast, including ammonium sulfate with the silica gel resulted in incomplete lecithin charring ... It has been known for some time that unsaturated compounds such as sphingomyelin are charred more readily with sulfuric acid than are saturated compounds such as dipalmityl lecithin.

... Gluck and Kulovich (60, 61) have not published an analogous set of standard curves for the plates prepared with ammonium sulfate ... Gebhardt and Dubbeldam (49) have recently shown that, densitometrically, L/S ratios measured after spraying with sulfuric acid are about double L/S ratios obtained after ammonium sulfate spray.

... In contrast, Sarkozi et al. (153) had previously shown very convincingly that lecithin and sphingomyelin, both in standard solutions and in amniotic fluid extracts, have nearly identical linear density curves when the chromatogram ist charred after dipping it into a modification of the same ammonium sulfate spray solution. It does appear that Sarkozi et al. are reporting L/S ratios that correspond to the actual ratio of the concentration of lecithin to the concentration of sphingomyelin..." (132)

Abb. 3 (übernommen aus Gluck (61))
Beziehung zwischen den Werten der L/S-Ratio nach densitometrischer, gravimetrischer und Flächenbestimmung



Dabei entspricht eine gravimetrische L/S-Ratio von 4 einer densitometrisch ermittelten L/S-Ratio von 2.

Die Ammoniumsulfatlösung scheint trotz der einfachen Handhabung nicht geeignet, da die geringe Schwärzung des Lecithins infolge unvollständiger Verkohlung zu einer sehr flachen Eichkurve und damit zu einer starken Verminderung der Präzision der Bestimmung - speziell bei niedrigen L/S-Ratio-Werten - führt.

4.4. Untersuchungen zur densitometrischen Auswertung

Nach der Standardisierung der Färbemethode wurde die densitometrische Auswertung hinsichtlich ihrer Präzision überprüft.

Geräte: Camag Electrophorese-Scanner
Camag Digital-Integrator ohne automatische Minimumerkennung
Beckman Schreiber 10"

Reagenzien: Serva-Standard: Dipalmityl-Lecithin
Sphingomyelin
Mischungsverhältnis 1:1, 2:1, 3:1, 4:1

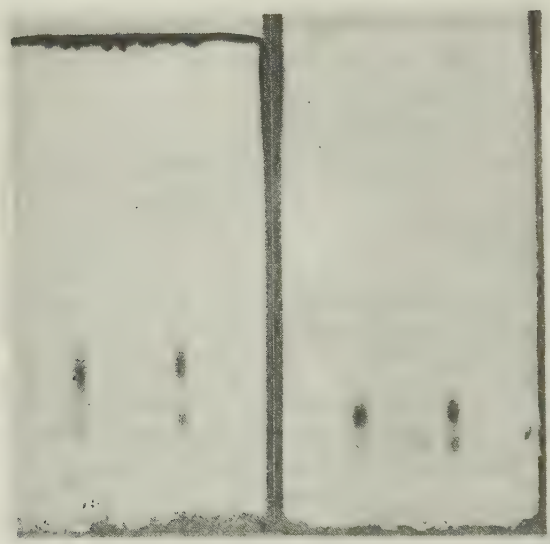
Auf die Chromatographieplättchen wurden jeweils nebeneinander Standards im Mischungsverhältnis 1:1/2:1 - 2:1/3:1 - 3:1/4:1 aufgetragen.
Nach Durchlaufen des Entwicklungs- und Färbeganges wurden die Flecken je 10 mal densitometriert und aus den integrierten Remissionen des Lecithin- und Sphingomyelinfleckes der Quotient gebildet.

Tabelle VIII Densitometrisch ermittelte Werte von Standardgemischen im Verhältnis 1:1 bis 4:1 bei 10fach Messung

1:1	$x = 1,19$	$S_x = 0,01$	$V_k = 0,59$
2:1	$x = 1,73$	$S_x = 0,03$	$V_k = 1,60$
3:1	$x = 2,17$	$S_x = 0,04$	$V_k = 1,82$
4:1	$x = 2,61$	$S_x = 0,05$	$V_k = 2,02$

Die in der Tabelle angegebene Präzision ist nur erreichbar, wenn Lecithin und Sphingomyelin ganz getrennt sind. Bei weniger vollständiger Auftrennung muß das Minimum der Remissionskurve mehr oder weniger willkürlich bei der Auswertung festgelegt werden, was bei Mehrfachmessungen zu einer Verminderung der Präzision führt.

Abb. 4 Gute und schlechte Auftrennung der Lipidflecken



Auffällig ist die Zunahme des Variationskoeffizienten mit steigender L/S-Ratio. Dieses Phänomen kann folgendermaßen erklärt werden:
Die Verstärkung ("gain") der Zählrate des Integrators soll so eingestellt werden, daß die Summenhöhe der Einzelfraktionen etwa 500 beträgt. (Diese Einheiten sind willkürlich festgesetzt.) Mit steigender L/S-Ratio (wachsende Fleckenintensität) muß der "gain" des Integrators gesenkt werden, damit die Summe konstant bei 500 bleibt. Das bedeutet, daß das Integral des Sphingomyelins relativ abnimmt, so daß sich Schwankungen dieses Wertes prozentual stärker bemerkbar machen.

Mithilfe von Standardmischungen wurden in 4 Serien à 3 Plättchen (1:1/2:1 - 2:1/3:1 - 3:1/4:1) Eichkurven erstellt. Die Mittelwerte aus jeweils 4 bzw. 8 Meßwerten können der Tabelle IX entnommen werden. Sie liegen der Präzisionseichkurve zugrunde.

Tabelle IX Mittelwerte aus 4 Serien von Standardmischungen im Verhältnis 1:1, 2:1, 3:1, 4:1

1:1	4	Mittelwerte	1,10
2:1	8	"	1,78
3:1	8	"	2,30
4:1	4	"	2,91

Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

Sämtliche Eichkurven sind gerade, unterscheiden sich aber geringfügig in der Steigung und schneiden sich im Punkt mit einem eingewogenen Verhältnis von 1:1. Die Eichkurve aus den Mittelwerten der 4 Serien (siehe Tabelle IX) dient als Referenzkurve

Die Eichkurven ändern ihre Lage und Steilheit von Tag zu Tag und auch in verschiedenen Plättchenserien; die Unterschiede sind jedoch im allgemeinen nicht größer als in der Abbildung 5 sichtbar, wenn die Methode "unter Kontrolle" ist.

Im Laufe der Arbeit zeigten die Phospholipide Veränderungen in Auftrennung und Wanderungseigenschaften. Der Sphingomyelinfleck war lang ausgezogen und unscharf begrenzt. Dieses Verhalten der Lipidflecken spiegelt sich im Schreiber durch breitbasige Peaks wider, deren Flächenintegrale prozentual erhöht sind. Daraus folgt ein verändertes Verhältnis der Meßwerte zueinander.

Zeitweise ging diese Veränderung des Sphingomyelinfleckes mit einer stark erhöhten Wanderungsgeschwindigkeit des Lecithinfleckes einher. Das Verhältnis der Remissionswerte zueinander zeigte dabei erhebliche Variationen und korrelierte in keiner Weise mit den Werten der oben angegebenen Eichkurven. Die Methode war nicht mehr "unter Kontrolle".

Ein Vergleich von Standardmischungen, die sich in ihrem Herstellungsdatum um einen Monat unterschieden, zeigte eine geringfügige Verminderung der Standardwerte und somit eine leichte Linksverschiebung der Eichkurve um 0,1 - 0,15 Einheiten im Vergleich zum frisch hergestellten Standard.
Die Remissionswerte sind der Tabelle X zu entnehmen.

Abb. 5 Eichkurven, erstellt aus Standardmischungen im Verhältnis 1:1, 2:1, 3:1, 4:1 in 4 Plättchenserien

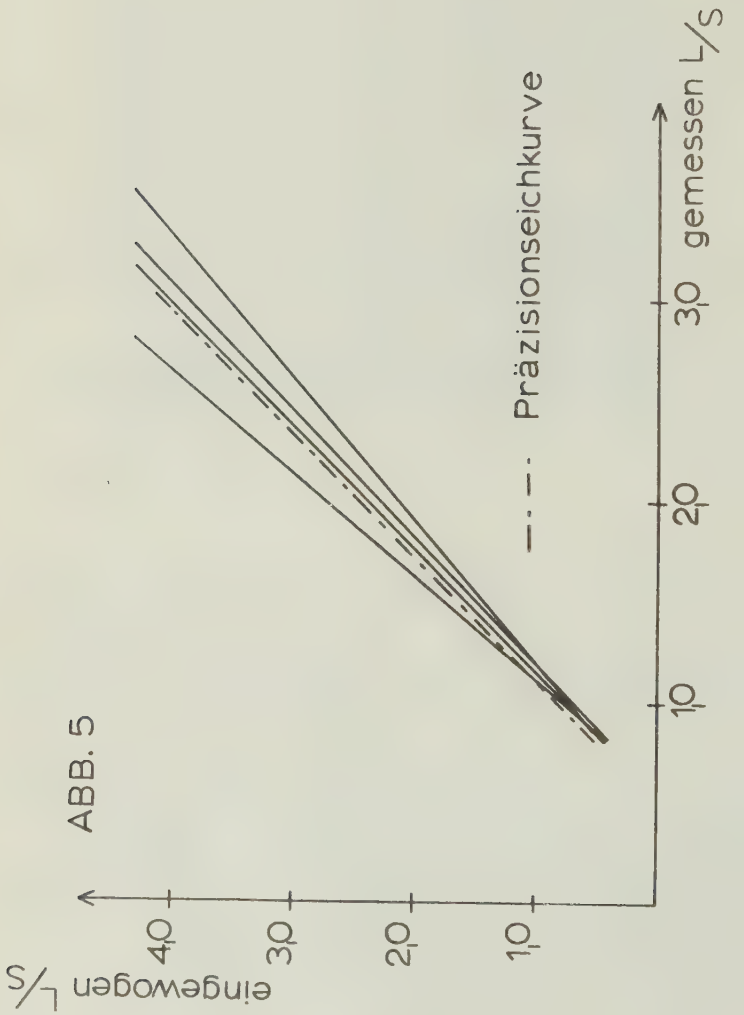


Abb. 6 Veränderte Auftrennung und Wanderungsgeschwindigkeit der Lipidflecken

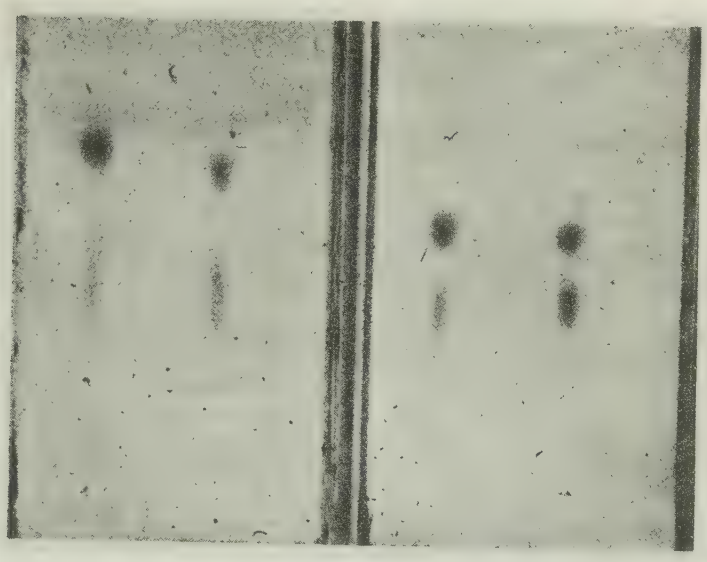


Abb. 7 Eichkurven von Standardmischungen unterschiedlichen Herstellungsdatums

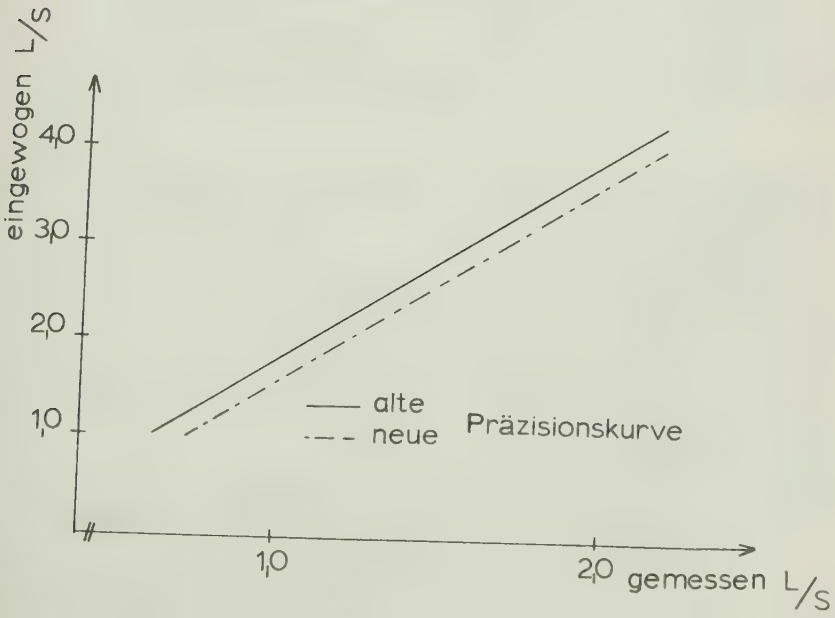


Tabelle X Meßwerte von Standardgemischen verschiedenen Herstellungsdatums

Standard-mischungen	neu		alt	
1:1	0,64 0,60	0,62	0,70 0,69	0,70
	0,62 0,63	0,63	0,75 0,77	0,76
2:1	1,04 1,04	1,04	1,09 1,12	1,11
	1,19 1,22	1,20	1,30 1,32 1,36	1,33
3:1	1,76 1,87 1,85	1,83	1,80 1,85	1,83
	1,74 1,77	1,76	1,87 1,90	1,88
4:1	2,03 2,03 1,99	2,02	2,0 2,01	2,01
	2,02 2,06	2,04	2,10 2,06 1,99	2,05

Beide Eichkurven liegen jedoch wesentlich niedriger (ca. 0,5 - 0,7 E) als die oben beschriebene Referenzeichkurve, deren Standard im Herstellungsdatum mit dem älteren dieser Kurven übereinstimmte.
Eine eindeutige Erklärung für diese Abweichung konnte nicht gefunden werden. Eine mögliche Begründung mag das unterschiedliche Verhalten in Trenn- und Laufeigenschaften sein, das sich ohne offensichtliche Ursache von Zeit zu Zeit zeigte.

Deshalb erschien es naheliegend, zur Klärung dieser Frage die einzelnen Arbeitsschritte getrennt zu überprüfen, um eventuell Einfluß nehmende Faktoren aufzufinden und auszuschalten.

4.5. Einflüsse auf die Trenneigenschaften der Dünnschichtplatten

Die folgenden Versuche dienten dazu, die Einflüsse auf die Trenneigenschaften der DC-Platten zu erkennen.

a) Frisch hergestellte Plättchen, von denen man eine Serie bei 100° 10 Min. lang aktiviert hatte, wurden in Hinblick auf das Trennverhalten eines 2:1 und 3:1 Standards miteinander verglichen.
Sowohl im visuellen Vergleich wie auch in der densitometrischen Auswertung ergab sich kein signifikanter Unterschied.

b) Frisch hergestellte aktivierte und nicht aktivierte Plättchen wurden nach Auftrag von Standard und frisch extrahiertem Fruchtwasser miteinander verglichen. Die Entwicklung erfolgte in einem neu angesetzten Laufmittel. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich des Trenn- und Laufverhaltens.

c) Ein Versuch zur Optimierung der Beschichtung durch vorheriges Waschen der Objektträger in Chloroform erzielte keine verbesserten Ergebnisse.

d) Zur Überprüfung des Temperatureinflusses während des Laufprozesses wurde eine Plättchenserie bei Zimmertemperatur, eine bei 11° C entwickelt. Mit abnehmender Temperatur verminderte sich die Laufstrecke und Laufgeschwindigkeit.

e) Der Einfluß der Laufmittelmenge erwies sich ebenfalls als unerheblich.

f) Durch Änderung der Laufmittelzusammensetzung ließ sich unterschiedliche Auftrennung erzielen. Mit abnehmendem Anteil an Ammoniumhydroxid (25 %ig) rückten die Lecithin- und Sphingomyelinflecken enger zusammen. (65/30/4 - 65/30/3 - 65/30/2) siehe Abb. 4.

g) Die letzte Untersuchung in diesem Rahmen konzentrierte sich auf den Vergleich von Plättchen, die am Vortag und am Tag selbst hergestellt worden waren. Von beiden wurde je eine Serie aktiviert. Auch in diesem Versuch zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede.

Das Lauf- und Trennverhalten variierte bei allen diesen Versuchen stark und zeigt z.T. normale Wanderungsgeschwindigkeit mit guter Trennschärfe, z.T. aber die oben beschriebenen Veränderungen in der Auftrennung, jedoch so unsystematisch, daß kein Rückschluß auf die eigentliche Ursache gezogen werden konnte.

Zur weiteren Überprüfung der Lauf- und Trenneigenschaften wurde ein Versuch mit frisch hergestelltem gereinigten Kieselgel angestellt. Nach der Empfehlung von Egge et al. (39), fand nur gereinigtes Kieselgel bei der Plättchenherstellung Verwendung, das sich auch in eigenen Ergebnissen durch visuellen Vergleich und densitometrische Messung des Untergrundes dem ungewaschenen gegenüber als überlegen erwies.

Dieser erneute Versuch zeichnete sich durch "normale" Laufeigenschaften bei guter Trennschärfe aus. Auch einzelne "Ausreißer" wurden nicht beobachtet.

Aus diesem Befund läßt sich folgern, daß die Kieselgel-Suspension bei längerem Stehen ihre Eigenschaften ändert. Bei ersten Anzeichen veränderter Auftrennung im Sinne des beschriebenen Phänomens sollte es durch neues ersetzt werden. Die tageweise auftretenden Schwankungen, die davon gut zu unterscheiden sind, scheinen hauptsächlich durch Feuchtigkeit, Wetter, Temperatur und andere nicht quantifizierbare Einflüsse herbeigeführt zu sein. Sie gehen jedoch im allgemeinen nicht über den Vertrauensbereich hinaus, lassen die Methode also nicht "außer Kontrolle" geraten.

Eine weitere Untersuchung galt der Präzision in Plättchenherstellung, Probenauftrag, Entwicklung, Besprühen und Veraschung.
Dazu werden 10 Plättchen mit je 2 Auftragspunkten eines 2:1 Standards wurden überprüft. Jeder Fleck wurde dreimal densitometriert.
Die Mittelwerte sind der Tabelle XI zu entnehmen.

Tabelle XI Mittelwerte bei 20-fach Bestimmung eines 2:1-Standards

1,94/1,86 - 2,20/2,10 - 1,97/1,87 - 2,14/2,09 - 2,10/2,05
1,89/1,95 - 1,96/1,93 - 2,17/2,14 - 2,22/2,05 - 2,03/1,95

Tabelle XII Präzisionsbestimmung aus Tabelle XI

	$\bar{x}$	S_x	V%	
alle Werte	2,03	0,11	5,49	
jeweils der erste Wert	2,06	0,12	5,77	5,38
jeweils der zweite Wert	2,00	0,10	4,98	

Der Variationskoeffizient aus den Doppelwerten (berechnet nach Snedecor) betrug 3,01 %.
Aus den Werten läßt sich ableiten, daß die Variationen innerhalb einer Platte (V% = 3 %) wesentlich geringer sind als von Platte zu Platte, (V% = 5,4 %) was im allgemeinen zu erwarten ist.
Mit diesem Versuch konnte die Präzision bei der Herstellung der Platten als zufriedenstellend nachgewiesen werden.

Für die Fruchtwasseruntersuchungen ergab sich daraus folgende Konsequenz: Auf jeder Platte muß neben der Probe ein Standard aufgetragen werden. Dabei erscheint es sinnvoll, 2 Serien à 3 Platten anzufertigen, auf die jeweils 1 µl Fruchtwasserextrakt neben einem Standard im Mischungsverhältnis 1:1, 2:1 und 3:1 appliziert wird. Für eine solche 6-fach Bestimmung benötigt man 6 µl Fruchtwasserextrakt.

Die weitere Arbeit konzentrierte sich auf die einzelnen Verarbeitungsschritte der Fruchtwasserprobe.

4.6. Versuche zur Extraktion der Phospholipide aus dem Fruchtwasser

Grundsätzlich unterscheidet man 2 Extraktionsmethoden, die "Flüssig-flüssig"- und die "Flüssig-fest"-Extraktion. In jüngerer Zeit rückt die "Flüssig-fest"-Extraktion in Säulen wegen ihrer einfacheren Durchführung bei sehr guter Trennung in den Vordergrund, während früher fast ausschließlich die "Flüssig-flüssig"-Methode nach Folch (45) verwendet wurde.

Prinzip der Säulenextraktion ist die Elution lipophiler Substanzen aus einer wässrigen Lösung. Durch Zugabe von organischen Lösungsmitteln auf die Säule, die mit grobporigem granuliertem Kieselgel gefüllt ist, werden die lipophilen Substan-

zen von der wässrigen Phase getrennt. Sie reichern sich im Lösungsmittel an und können so im Eluat in reiner Form gewonnen werden.
Die Extraktion ist bei jedem pH-Wert von pH1 bis pH 13 möglich. Selbst saure, neutrale und basische Bestandteile können sauber getrennt werden. Die Polarität mancher Substanzen (z.B. Phosphatide) erfordert die Verwendung von Lösungsmitteln mit hohem Anteil aliphatischer Alkohole. Dies führt bei der üblichen Elutionstechnik zum Abtreiben wässriger Phase von der Säule. In diesem Fall wird sie nur zum Teil mit wässriger Lösung beladen.
Nach diesem Prinzip arbeiten auch die "Extrelut"-Trennsäulen, die von der Fa. Merck serienmäßig hergestellt werden.

Folgender Arbeitsgang wurde vorgeschlagen:

a) 5 ml zentrifugiertes Fruchtwasser (Überstand) wird mit 5 ml CH_3OH versetzt, geschüttelt und auf eine zu 2/3 gefüllte Extrelut-Säule gegeben.
b) Einwirkzeit: 10-15 Min.
c) Das Fruchtwasser wird mit 15 ml Chloroform eluiert
d) Das Eluat wird aufgefangen und im Wasserbad (40°) unter N_2 zur Trockne eingedampft
e) Das Präzipitat wird in 20 µl $CHCl_3$ gelöst
f) Die Probe (1 µl) wird neben entsprechenden Standards aufgetragen.

Die weitere Verarbeitung erfolgt nach der Standardarbeitsmethode.

Die Auftrennung des Lecithins und des Sphingomyelins der Fruchtwasserprobe war qualitativ weniger gut als die des Standards. Der Lecithinfleck erschien oft überladen und tropfenförmig ausgezogen. Auf manchen Platten machte sich eine Doppelauftrennung des Lecithinfleckes bemerkbar. Dieses Phänomen wurde bereits von Gebhardt (49), der in seinen Versuchen eine "Flüssig-flüssig"-Extraktion verwendete, beschrieben.
Die Meßwerte dieser Serie sind der Tabelle XIII zu entnehmen.

Tabelle XIII Meßwerte einer nach der Extrelut-Methode extrahierten Fruchtwasserprobe

Standard	Verhältnis der Intensitäten von L:S	L/S-Ratio der Probe
1:1	0,93	3,23
2:1	1,61	3,26
3:1	2,26	3,06
4:1	2,55	3,14

Die Meßwerte des Standards lagen im Bereich der bereits ermittelten Eichkurven (s.S. 61). Das Fruchtwasser konnte mit einem Mittelwert von 3,17 als "reifes" Fruchtwasser klassifiziert werden, das mit einer voll ausgebildeten Lungenreife einhergeht.

Nach diesen Ergebnissen schien es interessant, die Säulenextraktion mit der Methode der "Flüssig-flüssig"-Trennung zu vergleichen.

Die meisten Verfahren zur Extraktion der Phospholipide aus dem Fruchtwasser sind Modifikationen der Folch-Extraktion. Um den Einfluß der Extraktion auf das Ergebnis untersuchen zu können, wurde je eine Fruchtwasserprobe nach der Arbeitsvorschrift von Kiyasu (88), Blass (9) und Gusdon (66) extrahiert, ferner wurde zum Vergleich die Trennung auf einer Extrelut-Säule durchgeführt.

Methode nach Kiyasu:

a) 1-2 ml des zentrifugierten Fruchtwassers mit 5 ml CH_3OH versetzen
b) mischen (Vortex) und bei 40° im Wasserbad 3 Min. stehen lassen
c) bei 500 g 3 Min. lang zentrifugieren
d) Überstand mit 10 ml $CHCl_3$ und 2 ml einer 2 molaren KCl-Lösung mischen
e) nach Absetzen der $CHCl_3$-Phase zweimal mit 3 ml H_2O waschen und anschließend den wässrigen Überstand entfernen
f) die $CHCl_3$-Phase zur Trockne eindampfen

Methode nach Blass:

a) 1,5 ml des Fruchtwasser-Überstandes mit 1,5 ml CH_3OH versetzen
b) 30 sec. mischen (Vortex)
c) 3 ml $CHCl_3$ zugeben, dann 90 sec. mischen
d) bei 4500 g 2-5 Min. zentrifugieren
e) $CHCl_3$-Phase abziehen und zur Trockne eindampfen

Methode nach Gusdon:

a) 1,5 ml des Fruchtwasser-Überstandes mit 3 ml CH_3OH und 1,5 ml $CHCl_3$ versetzen
b) die zuerst homogene Lösung durch Zugabe von 1,5 ml H_2O und 1,5 ml $CHCl_3$ trennen
c) die CH_3OH-Phase mit 1,5 ml $CHCl_3$ waschen
d) beide $CHCl_3$-Phasen vereinen und zur Trockne eindampfen

Die Anreicherung über die Extrelut-Säule wurde bereits beschrieben.

Zum Vergleich der 4 Extraktionsmethoden wurde als Probe ein frisches, geringfügig mit Blut kontaminiertes Fruchtwasser verwendet, das aus einer Blasensprengung stammte.

Bei der Durchführung wurden folgende Beobachtungen gemacht: Gibt man bei der Extraktion CH_3OH im Überschuß zu - wie es bei Kiyasu und Gusdon angegeben ist - so entsteht ein Koagel, welches bei den weiteren Extraktionsschritten stört. Eine Entfernung durch Zentrifugation ist zwar möglich, es ist jedoch nicht klar, ob damit nicht auch Phospholipide verlorengehen.

Durch Waschen der Chloroform-Phase erschien bei Kiyasu der Extrakt milchig trüb, während er in den anderen Techniken klar blieb.

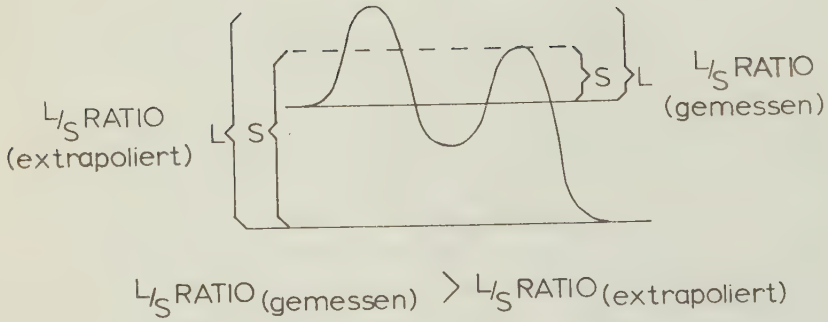
Die weitere Verarbeitung erfolgte entsprechend der Arbeitsanleitung. Die Meßwerte sind der Tabelle XIV zu entnehmen.

Tabelle XIV Meßwerte frischer Fruchtwasserproben nach verschiedenen Extraktionsmethoden

	Blass				Gusdon				Extrelut				Kiyasu			
	Standard		FW		Standard		FW		Standard		FW		Standard		FW	
1:1	1,06 1,05	1,05	4,20 4,36	4,28	0,91 0,86	0,89	2,29 2,05 1,92	2,09	1,06 1,05 1,09	1,07	2,24 2,07	2,15	1,06 1,10	1,08	3,22 2,96	3,09
2:1	1,60 1,54	1,57	3,92 4,28	4,10	1,62 1,55	1,58	2,52 2,61	2,57	1,49 1,58	1,54	2,42 2,30	2,36	1,74 1,70	1,72	3,44 3,20	3,32
3:1	2,30 2,30	2,30	4,23 4,13	4,18	2,27 2,42	2,35	2,06 2,19	2,12	2,22 2,13	2,18	2,38 2,35	2,36	2,30 2,30	2,30	3,19 3,32	3,26

Die Standard-Meßwerte liegen im Bereich der Präzisionseichkurve

Eine Schwierigkeit in der densitometrischen Auswertung ergibt sich durch die Verschiebung der Nullinie vor und nach der Integration (siehe Skizze). Dadurch kommt es zu einer Änderung des Verhältnisses der Flächenintegrale zueinander, je nachdem welche Nullinie man als Referenzlinie wählt. Die Nullinie vor den "peaks" führt zu einer erhöhten L/S-Ratio, die zweite dagegen macht eine Extrapolation des ersten Flächenintegrals, eventuell sogar mit Auszählung der Flächenquadrate unter der Kurve erforderlich (siehe Sizze).



$L/S\ RATIO_{(gemessen)} > L/S\ RATIO_{(extrapoliert)}$

Die höchsten Meßwerte erschienen nach der Blass'schen Extraktion. Es folgten in der Reihenfolge absteigend die Methoden von Kiyasu, Gusdon und Extrelut, wobei sich die beiden letzten kaum unterschieden.

Nach mehreren Vergleichen wurde die Extrelut-Methode von der weiteren Anwendung ausgeschlossen. Sie bietet weder optisch

noch densitometrisch gegenüber der einfacheren und weniger zeitaufwendigen "Flüssig-flüssig"-Extraktion einen Vorteil. Außerdem erfordert sie bei Verwendung der käuflichen Säulen relativ viel Fruchtwasser (5 ml bei nur zu 2/3 gefüllter Säule). Zudem bereitete das große Volumen an organischem Lösungsmittel (15 ml), in dem sich die Lipide anreichern, Probleme bei der Verdampfung. Die gemessenen Remissionswerte in dieser Methode lagen niedriger als in anderen Techniken.

Vergleich der Extraktion nach Blass und einer modifizierten Methode nach Gusdon

Wegen der störenden Koagelbildung nach Zugabe eines gleich großen bzw. größeren Volumens von CH_3OH zum Fruchtwasser oder bei Überwiegen des Methanols gegenüber dem Chloroform wurde die Methode nach Gusdon modifiziert. Die geringfügige Änderung, die von der Waschung der CH_3OH-Phase mit Wasser absieht und gleich große Volumina von CH_3OH und $CHCl_3$ mischt, beruht auf experimentellen Erfahrungen im eigenen Labor.

Methode nach Blass: siehe oben

Methode nach Gusdon (modifiziert):

a) 1,5 ml des Fruchtwasser-Überstandes werden mit 3 ml CH_3OH versetzt und gemischt
b) Zugabe von 3 ml $CHCl_3$, mischen (Vortex)
c) zentrifugieren
d) $CHCl_3$-Phase abziehen, CH_3OH-Phase erneut mit 3 ml $CHCl_3$ versetzen und mischen
e) beide $CHCl_3$-Phasen vereinen und evaporieren

Als Material diente:

1) geringfügig blut-kontaminiertes Fruchtwasser
2) frisches Fruchtwasser

Die Ergebnisse des Vergleiches der beiden Techniken sind in Tabelle XV dargestellt.

Tabelle XV Blutkontaminiertes und frisches Fruchtwasser, nach Blass und Gusdon (modifiziert) extrahiert

	A				B				C				D			
	Standard		FW		Standard		FW		Standard		FW		Standard		FW	
a	0,79	0,78	2,38	2,16	1,01	1,02	2,35	2,30	1,02	1,02	2,57	2,49	0,76	0,76	3,80	3,84
	0,76		1,94		1,03		2,26		1,02		2,42		0,76		3,88	
b	1,69	1,74	2,10	2,04	1,47	1,47	1,82	1,91	1,70	1,72	2,51	2,43	1,43	1,40	6,42	6,42*
	1,79		1,97		1,47		2,00		1,74		2,35		1,38		6,42	
c	2,14	2,18	2,44	2,39	1,94	1,97	1,71	1,71	2,26	2,23	4,78	4,84	2,00	2,04	5,05	5,16*
	2,22		2,35		2,01		1,71		2,20		4,90		2,08		5,27	

A (Blass)
B (Gusdon (modif.)) } blutkontaminiertes Fruchtwasser

C (Blass)
D (Gusdon (modif.)) } frisches Fruchtwasser

a Standard 1:1 -FW
b Standard 2:1 -FW
c Standard 3:1 -FW

* Ausreißer aufgrund von Verschmutzung innerhalb der Lipidflecken.

Die Eigenschaften der Proteinzwischenschicht werden, wie bereits im theoretischen Teil angesprochen, durch die Extraktionstechnik beeinflußt. In der Blass'schen Methode entsteht ein fest zusammenhängender Proteinring, der weiß, bei Kontamination aber rot oder grünlich gefärbt ist.

In der modifizierten Extraktion nach Gusdon ist die Schicht locker gefügt und löst sich bei Durchstoßen mit der Pasteurpipette in Flöckchen auf, die die klare CH_3OH-Phase durchsetzen.

In diesem Versuch machte sich eine starke Variabilität der Meßwerte bemerkbar, die nicht nur auf die Fruchtwasserproben zutraf. Gründe für diese Abweichungen wurden bereits auf Seite 61/64-66 angesprochen.

Bei der Überprüfung der Extraktionsmethoden sind folgende Punkte besonders wichtig:
a) Reduzierung der Überlagerung mit anderen Lipiden,
b) Vermeidung von Schmutzeffekten und Ausziehungen
c) gute Trennung der L- und S-Flecken
d) scharfe Begrenzung der Lipidflecken

Weiterhin muß der Einfluß von Hämoglobin auf
a) Extraktion
b) Auftrennung, eventuelle Schmutzeffekte
c) aktuelle L/S-Ratio
untersucht werden, da gerade in kritischen Fällen oft blutkontaminiertes Fruchtwasser zur Verfügung steht.

Zur Klärung des Einflusses von Blut in identischem Fruchtwasser auf die L/S-Ratio wurden zwei Versuche angesetzt.
1) Unter Verwendung von gekühltem Fruchtwasser wird eine "unbelassene" Portion mit einer, die mit sechsfach gewaschenem Bluthämolysat im Verhältnis 9:1 versetzt worden ist, verglichen.
2) Frisches Fruchtwasser wird zum Teil mit Hämokomzentrat versetzt. Beide Fraktionen werden miteinander verglichen.

In beiden Versuchen finden die Extraktionsmethoden nach Blass und Gusdon (modifiziert) Anwendung.
Die Proben wurden je neben einem 3:1 Standard aufgetragen, der am selben Tag neu angesetzt worden war (Serva).

Die Applikation erfolgte nach Zugabe von je 40 µl $CHCl_3$ zum Evaporat der 4 Fraktionen.

Die Meßwerte sind in der Tabelle XVI einsehbar.

Die große Streubreite der Werte von Standard und Probe, besonders im ersten Versuch (s. Tabelle XVIa) erschwert eine eindeutige Aussage.

Es läßt sich jedoch annäherungsweise sagen, daß die Meßwerte in beiden Versuchen nach Beimengung von Hämolysat zum Fruchtwasser in der Blass'schen Extraktion geringfügig niedriger lagen, während sie sich in der Gusdon'schen Extraktion einander entsprachen.

Eine Begründung für die relativ starken Schwankungen darf bei genauem Betrachten der Plättchen in den punktförmigen Verunreinigungen gesehen werden, die wahrscheinlich durch eine Verschmutzung während des Veraschungsvorganges im Abzug entstehen. Sie wirken sich störend bei der densitometrischen Auswertung aus und verändern durch Alteration der Flächenintegrale die resultierende L/S-Ratio. Bei der zur Verfügung stehenden Apparatur ist dieser Einfluß nicht zu eliminieren.

Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung sind darüber hinaus von der Farbintensität der Flecken entsprechend der aufgetragenen Lipidkonzentration abhängig.

Bei sehr geringer oder sehr starker Farbintensität ebenso wie bei unvollständiger Auftrennung der Lipidflecken brachte die Densitometrie nicht verwertbare Ergebnisse.
Vergleiche mit ausgezählten Kurvenintegralen zeigten, daß in niedrigen Konzentrationsbereichen die L/S-Ratio bei weitem zu hoch angegeben wird, da der schwächere Sphingomyelin-Fleck in den Untergrundschwankungen fast vollständig verschwindet, vor allem, wenn die erste Nullinie (vor der Kurve) als Referenznullinie gilt (s. Seite 72).

Bei überladenen Flecken (besonders bei "reifem" Fruchtwasser) kann die Densitometrie die intensive Schwärzung nicht durch entsprechende Peaks wiedergeben, die L/S-Ratio ist mithin relativ zu niedrig.

Tabelle XVIa Meßwerte von Fruchtwasserproben mit und ohne Hämolysatzusatz

	Gusdon (modifiziert)						Blass					
gekühltes FW	4,02	4,01	3,79	3,79	3,97	4,00	4,96	4,93	5,05	5,06		
	4,01		3,79		4,04		4,90		5,07			
Standard 3:1	1,53	1,55	1,84	1,88	1,89	1,87	1,73		2,17			
	1,58		1,93		1,84		1,76	1,70	2,13	2,13		
							1,60		2,08			
gekühltes FW mit Hämolysat	3,39		4,23		3,62	3,64	3,22	3,21	3,47		3,50	
	3,70	3,51	3,94	4,01	3,67		3,20		3,38	3,36	3,53	3,45
	3,81		3,87						3,24		3,32	
Standard 3:1	2,03		1,85	1,83	1,90	1,92	2,39		1,90		1,64	
	2,09	2,06	1,81		1,94		2,37	2,40	1,89	1,92	1,65	1,66
	2,06						2,43		1,97		1,70	

Tabelle XVIb Meßwerte von Fruchtwasserproben mit und ohne Hämolysatzzusatz

	Gusdon (modifiziert)				Blass			
frisches FW	4,50 5,15	4,82	5,38 5,45	5,41	4,02 4,05	4,04	3,75 3,66	3,70
Standard 3:1			1,73 1,72	1,72			1,80 1,89	1,85
frisches FW mit Hämolysat	4,25 4,35	4,30	4,65 4,69	4,67	3,10 3,16	3,13	3,01 3,22	3,10
Standard 3:1			1,53 1,59	1,56			1,67 1,77	1,72

Bei unvollständiger Auftrennung liegt der Hauptfehler in der manuellen Zwischenintegration, da zwischen den einzelnen Peaks kein eindeutiges Minimum der Extinktion erkennbar ist. Die Auswertung der Lipidflecken ist besonders problematisch bei Vorliegen hoher Lipidkonzentrationen, die sich in einer weiten Ausziehung der Flecken und geringer Trennschärfe äußert.

Probenreinigung durch Petroläther

Zur Optimierung der Auftrennung wurde in einem Versuch die Reinigung des unzentrifugierten Fruchtwassers mit Petroläther überprüft.
Durch dieses Verfahren können neutrale Lipide und eventuell saure Phospholipide, die der Vermutung entsprechend zum Überladungseffekt auf der Platte beitragen können, im Scheidetrichter ausgeschüttelt werden.

Vorgehen:

a) 5 ml zentrifugiertes "reifes" Fruchtwasser werden mit 25 ml Petroläther im Scheidetrichter ausgeschüttelt.
b) nach Absetzen wird die wässrige Phase abgelassen und wie zentrifugiertes Fruchtwasser weiterverarbeitet.
c) zum Vergleich wurde eine Probe des Fruchtwassers wie bisher zentrifugiert.
d) Extraktion und Entwicklung der mit Petroläther gewaschenen und der zentrifugierten Probe erfolgten parallel.

Bei Betrachtung der Platten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Proben. Auch densitometrisch ließ sich keine Verbesserung in der Auftrennung und Schärfe der Begrenzung der Flecken durch Waschung mit Petroläther feststellen.

Die Meßwerte sind der Tabelle XVII zu entnehmen.

Dabei bedeutet:

a, b, c: einfach zentrifugierte Proben, neben einem 3:1 Standard aufgetragen
Pa, Pb, Pc: mit Petroläther behandelte Proben

Tabelle XVII Meßwerte von Fruchtwasserproben mit und ohne Petroläther-behandlung

	a	b	c	Pa	Pb	Pc
Standard 3:1	2,64 2,57 2,60	1,95 1,91 1,88 1,80	2,3 2,02 2,15 2,09	2,20 2,24 2,22	1,95 1,97 1,96	2,11 2,02 2,06
Probe	6,82 7,19 7,0*	4,11 4,46 4,49 4,91	6,72 6,95 6,83*	4,54 4,43 4,49	4,35 4,70 4,75 5,25	5,71 5,62 5,67

Lokale Verschmutzungen durch den Abzug erklären auch hier die Streuung der Meßwerte, besonders des Ausreißers (Probe a und c) *

Schlußfolgerungen:

a) Die Blass'sche Extraktion ist der Extraktion nach Gusdon (original und modifiziert) und den anderen "Flüssig-flüssig"-Extraktionen sowie der Extrelut-Methode wegen ihrer einfacheren Durchführung vorzuziehen.
Sie zeigte im optischen Vergleich die beste Trennschärfe. Die Ergebnisse sind nicht signifikant verschieden von denen anderer Extraktionsmethoden.
In späteren Versuchen wurde die Methode dahingehend modifiziert, daß Methanol und Chloroform nicht getrennt dem Fruchtwasser-Überstand zugegeben werden, sondern als Gemisch ($CHCl_3/CH_3OH$ = 2:1, v:v).

b) Platten mit grober Verschmutzung können densitometrisch nicht ausgewertet werden. Der visuelle Vergleich der Flecken der Probe mit denen des Standards gibt erste Anhaltspunkte über die Reife des Fruchtwassers, bedarf aber densitometrischer Präzisierung, die an gut getrennten Proben vorgenommen werden muß.
Bei einem 6-8fach-Ansatz jeder Fruchtwasserprobe ist mit einer ausreichenden Anzahl an "guten" Platten mit auswertbaren Fleckauftrennungen zu rechnen.

c) Oftmals erweist es sich als ratsam, die Proben in 2 zeitlich aufeinanderfolgenden Serien aufzutragen, da es unter Umständen notwendig ist, die Konzentration der applizierten Menge zu erhöhen oder zu erniedrigen, um so die densitometrische Auswertung im Bereich mittlerer Schwärzung zu ermöglichen.

d) Die Verwendung von blutkontaminiertem Fruchtwasser ist nicht empfehlenswert. Steht jedoch nur blutkontaminiertes Fruchtwasser zur Verfügung, so kann es bedenkenlos verarbeitet werden.
Die L/S-Ratio einer solchen Probe liegt bei normaler Extraktion im gleichen Bereich oder nur geringfügig niedriger.

Durch die Versuche konnte nicht geklärt werden, ob stärker abgebautes Hämoglobin einen größeren Einfluß auf das Ergebnis hat. Dies ist jedoch aus biochemischen Gründen unwahrscheinlich.

4.7. Versuche zur Acetonpräzipitation

Von besonderem Interesse im Rahmen dieser Arbeit ist die Frage der Notwendigkeit der Acetonpräzipitation.
Das Ziel der Acetonpräzipitation ist die Trennung von oberflächenaktivem Lecithin (Dipalmityl-Lecithin), das in kaltem Aceton unlöslich sein soll, von einer nicht oberflächenaktiven, aceton-löslichen Fraktion. Mit dieser Hypothese begründet Gluck (57, 58, 59) die Notwendigkeit dieses Schrittes.
In der Diskussion über Für und Wider, die bereits im theoretischen Teil dieser Arbeit referiert wurde, gehen die Meinungen in entgegengesetzte Richtungen, jeweils unterstützt durch entsprechende Untersuchungsergebnisse. Es ist unverständlich, wie unterschiedliche Auffassungen über einen methodischen Schritt von namhaften Autoren vertreten und aufgrund von Laborbefunden aufrecht erhalten werden.

Es ist Ziel dieses Teils der Arbeit, in einigen Versuchen die Problematik dieses Schrittes zu beleuchten und eventuell eine Antwort auf die Frage der Notwendigkeit der Acetonpräzipitation zu finden.

Die Beschreibungen der Acetonpräzipitation unterscheiden sich in den quantitativen Angaben bezüglich der zugegebenen Menge an Aceton und der Dauer der Kühlung.
Beim Vergleich der einzelnen Arbeitsanleitungen zu diesem Schritt erschien folgende Methode als einfachste und beste:

a) zur Trockne eingedampfter Extrakt wird mit 50 µl Chloroform aufgenommen
b) Zugabe von 3 ml kaltem wasserfreiem Aceton (4°)
c) Kühlung bei -18° / 3 Std. lang
d) Zentrifugation der Probe bei 7500-8000 U/min.
e) der Überstand wird abdekantiert und das Präzipitat evaporiert.

Die weitere Verarbeitung erfolgt entsprechend der Standardarbeitsanleitung.

In einem ersten Versuch wurde frisches, geringfügig mit Blut kontaminiertes Fruchtwasser nach drei verschiedenen Methoden extrahiert und anschließend mit und ohne Acetonpräzipitation weiterverarbeitet.
Die Ergebnisse sind in Tabelle XVIII zusammengefaßt.

Tabelle XVIII Meßwerte frischer Fruchtwasserproben mit und ohne Acetonpräzipitation nach verschiedenen Extraktionsmethoden

mit Acetonpräzipitation

	Blass				Gusdon				Extrelut			
	Standard		FW		Standard		FW		Standard		FW	
1:1	0,92		2,10		1,03		1,39		0,99		1,56	
	0,92	0,92	2,30	2,20	0,92	1,01	1,49	1,46	0,98	0,98	1,48	1,52
	0,93				1,06		1,51					
2:1	1,71		2,16		1,62		1,49		1,58			
	1,62	1,67	2,22	2,19	1,51	1,60	1,55	1,49	1,50	1,54		
	1,67				1,68		1,43					
3:1	1,95		2,33		2,33		1,59		2,42		1,78	
	2,07	2,04	2,19	2,26	2,43	2,42	1,54	1,60	2,30	2,36	1,65	1,72
	2,10				2,50		1,67					

ohne Acetonpräzipitation

	Blass				Gusdon				Extrelut				Kiyasu			
	Standard		FW		Standard		FW		Standard		FW		Standard		FW	
1:1	1,06		4,2		0,91		2,29		1,06		2,24		1,06		3,22	
	1,05	1,05	4,36	4,28	0,86	0,89	2,05	2,09	1,05	1,07	2,07	2,15	1,10	1,08	2,96	3,09
							1,92		1,09							
2:1	1,60		3,92		1,62		2,52		1,49		2,42		1,74		3,44	
	1,54	1,57	4,28	4,10	1,55	1,58	2,61	2,57	1,58	1,54	2,30	2,36	1,70	1,72	3,20	3,32
3:1	2,30		4,23		2,27		2,06		2,22		2,38		2,30		3,19	
	2,30	2,30	4,13	4,18	2,42	2,35	2,19	2,12	2,13	2,18	2,35	2,36	2,30	2,30	3,32	3,26

Die Acetonpräzipitation führte in allen Fällen zu niedrigeren Werten. Es blieb jedoch die Reihenfolge in der Höhe der Werte nach den verschiedenen Extraktionsmethoden - beim Vergleich der in kaltem Aceton präzipitierten Proben mit den unbehandelten - erhalten, wie aus Tabelle XVIII hervorgeht. Von der Serie "C" (Kiyasu) wurde keine Acetonpräzipitation durchgeführt.

Einfluß der Kühlung

Ein weiterer Versuch konzentrierte sich auf das Verhalten der Meßwerte von Fruchtwasserproben mit und ohne Acetonpräzipitation, wobei ein Teil nur eine Stunde, ein anderer 48 Stunden bei -18° gekühlt wurde.

Als Material diente:
1) blutkontaminiertes Fruchtwasser (1 Tag alt)
2) frisches Fruchtwasser ohne Blutkontamination

Die Meßwerte sind der Tabelle XIX zu entnehmen.

Es bedeutet:
A blutkontaminiertes Fruchtwasser
B frisches Fruchtwasser
   1) ohne Acetonpräzipitation
   2) mit Acetonpräzipitation (1 Std./ -18°)
   3) mit Acetonpräzipitation (48 Std./-18°)
      a) Standard 1:1 - FW
      b) Standard 2:1 - FW
      c) Standard 3:1 - FW

Die Extraktion erfolgte nach der Methode von Blass.

Aufgrund der von Gluck beschriebenen und im vergangenen Versuch bestätigten Konzentrationsminderung durch den Acetonpräzipitationsschritt wurde das Präzipitat nach Eindampfen nur in der Hälfte der $CHCl_3$-Menge (20 µl) gegenüber der unbelassenen Probe (40 µl) aufgenommen.

Tabelle XIX Meßwerte von geringfügig blutkontaminiertem und frischem Fruchtwasser mit und ohne Acetonpräzipitation
Extraktion nach Blass - verschiedene Kühlzeiten

A blutkontaminiertes Fruchtwasser

	1:1 a) Standard		FW		2:1 b) Standard		FW		3:1 c) Standard		FW	
1) ohne Aceton-präzipitat.	0,79		2,38		1,69		2,10		2,14		2,44	
	0,76	0,78	1,94	2,66	1,79	1,74	1,97	2,04	2,22	2,18	2,35	2,39
2) Aceton-präzipitat. 1 Stunde	0,88		2,93		1,58		2,93		2,69		2,23	
	0,91	0,90	2,72	2,82	1,66	1,62	2,82	2,87	2,74	2,72	2,46	2,34
3) Aceton-präzipitat. 48 Stunden	0,44		2,06		1,10		3,26		1,70		2,59	
	0,47	0,46	2,16	2,11	1,12	1,12	3,32	3,29	1,79	1,75	2,47	2,53

B frisches Fruchtwasser

	1:1 a) Standard		FW		2:1 b) Standard		FW		3:1 c) Standard		FW	
1) ohne-Aceton-präzipitat.	1,02		2,57		1,70		2,51		2,20		4,78	
	1,02	1,02	2,42	2,49	1,74	1,72	2,35	2,43	2,26	2,23	4,90	4,84
2) Aceton-präzipitat. 1 Stunde	0,93				1,60		3,95		4,99		4,09	
	0,92	0,93	5,37	5,37*	1,56	1,58	4,01	3,98	2,13	2,07	4,04	4,07
3) Aceton-präzipitat. 48 Stunden	0,57		3,15		0,98		2,28		1,78		1,92	
	0,59	0,58	3,25	3,20	0,87	0,92	2,45	2,37	1,64	1,71	1,72	1,82*

Aus dem optischen Vergleich der Plättchen wird trotz Auftrags höherer Konzentrationen (20 µl statt 40 µl Lösungsmittel) ein gravierender Verlust an Lipiden nach Acetonpräzipitation deutlich, sichtbar durch die abnehmende Farbintensität der Lipidflecken. Dabei sind Lecithin und Sphingomyelin bei verschiedenen Kühlzeiten in gleicher Weise vermindert; die Sphingomyelinflecken erschienen dabei so schwach gefärbt, daß sie densitometrisch kaum noch auswertbar waren. Die Lecithinflecken entsprachen in ihrer Intensität denen des Standards, während die der unbelassenen Probe eine wesentlich stärkere Schwärzung erreichten. Die sehr niedrigen Standardmeßwerte der Serie "3" können eventuell durch die tageweisen Schwankungen (48 Stunden später!) erklärt werden.

Im Verlaufe der Untersuchungen zeigte sich, daß die densitometrische Messung nur im Mittelbereich, d.h. bei mittlerer Schwärzung der Flecken zuverlässig und damit zulässig ist. Außerhalb dieser Grenzen traten große Fehler auf, die sich durch den Vergleich mit den Ergebnissen nach Auszählung der Flächenquadrate unter der Kurve objektivieren ließen. Bei zu starker Schwärzung kann der Densitometer die Farbintensität nicht linear messen und wiedergeben; der Quotient der Remissionswerte L:S erscheint zu niedrig. Umgekehrt kann bei zu geringer Schwärzung der L:S-Wert ansteigen, da der Sphingomyelinfleck sich kaum von den Untergrundschwankungen abhebt und durch sehr geringe Remissionswerte wiedergegeben wird.

Bei Verarbeitung der Fruchtwasserprobe kann es daher notwendig sein, den Versuch in erniedrigter oder erhöhter (besonders gilt dies für Aceton-präzipitierte Fruchtwasserproben) Konzentration zu wiederholen, um eine Farbintensität der Flecken im mittleren Bereich zu erhalten. Dabei läßt sich jedoch weitgehend schon durch den visuellen Vergleich der Flecken eine Aussage über die zu erwartende Lungenreife machen. Entspricht nämlich die Farbintensität des Lecithinfleckes der des Standards, während der Sphingomyelinfleck kaum sichtbar ist, so liegt mit Sicherheit ein Quotient L:S von mehr als 3 zugrunde. Entspricht die Farbintensität des Sphingomyelinfleckes der des Standards, während der Lecithinfleck dunkelschwarz und über-

laden erscheint, so kann man ebenfalls eine L/S-Ratio von mehr als 3 annehmen.

Diese groben Aussagen verlangen bei geeigneter Konzentration eine genauere densitometrische Quantifizierung.

In einem weiteren Versuch wurde die Wirkung der Acetonpräzipitation auf normales Fruchtwasser und Fruchtwasser, dem Hämoglobin zugesetzt worden war, überprüft. Dabei galten der Trennung und Grenzschärfe der Lipidflecken, der Lecithinkonzentration auf der Platte und der aktuellen L/S-Ratio nach Behandlung mit kaltem Aceton besondere Aufmerksamkeit.

Fruchtwasser, das zum Teil mit Hämolysat versetzt worden war, wurde in vier Portionen geteilt. Die Extraktion erfolgte nach den Methoden von Blass und Gusdon (modifiziert). Der Versuch konzentrierte sich auf den Vergleich der Werte unter Einbeziehung bzw. Auslassung der Acetonpräzipitation.

Die Meßwerte sind der Tabelle XX zu entnehmen, dabei bedeutet:

A Fruchtwasserprobe
B Fruchtwasserprobe mit Hämolysatzusatz
  a) Blass
  b) Gusdon (modifiziert)
    1) ohne Acetonpräzipitation
    2) mit Acetonpräzipitation

Die unbelassenen Proben wurden in 40 µl $CHCl_3$, die Proben nach Acetonpräzipitation in 20 µl $CHCl_3$ aufgenommen und neben einem 3:1-Standard aufgetragen.

Die Farbflecke der Proben nach Acetonpräzipitation zeigten eine signifikant verminderte Intensität bei guter Trennung und Grenzschärfe. Die L/S-Ratio war bei der nach Blass extrahierten Fraktion in beiden Serien erniedrigt, während sich die Werte nach der Gusdon'schen (modifiziert) Extraktion einander weitgehend entsprachen mit einer geringfügigen Tendenz zu niedrigeren Werten.

Tabelle XX Meßwerte von Fruchtwasserproben mit und ohne Acetonpräzipitation

	A Fruchtwasser unbelassen								B Fruchtwasser mit Hämolysat							
	a) Blass				b) Gusdon				a) Blass				b) Gusdon			
	3:1 Standard		FW		3:1 Standard		FW		3:1 Standard		FW		3:1 Standard		FW	
1) ohne Aceton-präzi-pitat.	1,73		4,90		1,53		4,02		2,39		3,22		2,03		3,39	
	1,76	1,70	4,96	4,93	1,58	1,55	4,01	4,01	2,37	2,40	3,20	3,21	2,09	2,06	3,70	3,51
	1,61								2,43				2,06		3,81	
					1,84		3,79		1,90		3,47		1,85		4,23	
					1,93	1,88	3,79	3,79	1,89	1,92	3,38	3,36	1,81	1,83	3,94	4,01
									1,97		3,24				3,87	
	2,17		5,05		1,89		3,97		1,64		3,53				3,62	
	2,13	2,13	5,07	5,06	1,84	1,87	4,04	4,0	1,65	1,66	3,50	3,45			3,67	3,64
	2,08								1,70		3,32					
2) mit Aceton-präzi-pitat.	1,58		3,60				3,67		2,06		3,20				3,53	
	1,67	1,63	3,79	3,70			3,64	3,66	2,0	2,03	3,18	3,19			3,64	3,59
	1,73		2,60		1,74		4,04		1,80		2,18		1,87		3,05	
	1,59	1,66	2,59	2,60	1,70	1,72	4,07	4,06	1,69	1,75	2,32	2,25	1,76	1,82	3,0	3,03
					2,26		4,79		1,74		2,38		1,87		4,15	
					2,20	2,23	4,90	4,85	1,71	1,73	2,30	2,34	1,77	1,82	3,84	4,0

Diese Ergebnisse deuten auf einen bedeutenden Lecithinverlust hin, der die Konzentrationsabnahme des Sphingomyelin noch überwiegt und somit zu einer Verminderung der L/S-Ratio führt, die aber prozentual nicht quantifizierbar ist. Mit diesem vorläufigen Ergebnis zeigt sich schon eine Tendenz zu einer der beiden Seiten, die in der Literatur mit Nachdruck vertreten werden.

Die Werte der Fruchtwasserproben mit Hämolysatzusatz liegen fast ausnahmslos niedriger als die der unbelassenen Probe. Das Verhalten in der Acetonpräzipitation jedoch entspricht sich; auch bei den hämolysierten Proben ist eine Tendenz zu einer Verminderung der L/S-Ratio durch die Acetonbehandlung sichtbar.

4.8. Acetonpräzipitation von ^{14}C-Lecithin und ^{14}C-Sphingomyelin

Nach den bisherigen Ergebnissen kann eine Reihe wichtiger Fragen zur Acetonpräzipitation nicht eindeutig beantwortet werden.

1) Wird Dipalmityllecithin, das von vielen Autoren mit dem oberflächenaktiven Anteil des Surfactant gleichgesetzt wird, von kaltem Aceton quantitativ präzipitiert? (Wenn DPL, dessen Oberflächenaktivität mithilfe der Wilhelmy-Waage hinreichend überprüft wurde, annähernd vollständig von kaltem Aceton präzipitiert wird, so kann aufgrund dessen eine "gewisse" Präzipitierbarkeit einer oberflächenaktiven Fraktion des Fruchtwasser-Lecithin angenommen werden.)

2) Kommt es durch die Acetonpräzipitation zu einer Konzentrationsminderung einer oder mehrerer Phospholipidfraktionen (evtl. durch chemische Umwandlung)?

3) Verschiedentlich kam es in der Dünnschichtchromatographie zu einer Doppelauftrennung des Sphingomyelin-Fleckes, die auch bereits in der Literatur beobachtet wurde. (49) Besteht die Möglichkeit, daß sich diese beiden Fraktionen aufgrund verschiedener Fettsäurereste bei der Acetonpräzipitation unterschiedlich verhalten?

Diese Fragen sind wegen der relativ schlechten Präzision der L/S-Ratio Bestimmung und der beobachteten Tendenz zu "Ausreißern" mit der bisherigen Technik nur dann zu beantworten, wenn ein Meßwert ein Mittel aus mindestens 10 verwertbaren Einzelwerten darstellt.
Derartige Versuche sind schon wegen der benötigten Fruchtwassermengen kaum durchführbar.
Wir entschlossen uns daher zu einer Klärung der Fragen durch Zugabe von ^{14}C-markierten Phospholipiden zum Fruchtwasser.

Reagenzien:
NEC-648 Phosphatidylcholin (Cholin-Methyl ^{14}C)
0,01 mCi in 0,15 mg/0,5 ml Äthanol/Toluol (1:1, v:v)
NEC-663 Sphingomyelin (Cholin-Methyl ^{14}C) vom Rind
0,01 mCi in 0,17 mg/o,5 ml Methanol/Toluol (1:1, v:v)

Beide Substanzen wurden von NEN bezogen

Scintillatorflüssigkeit
1 l Toluol
5 g PPO
0,3 g Dimethyl-POPOP
} von Packard

Material:
Plastikflaschen (Inhalt 20 ml)
Reagenzgläschen aus Glas
Eppendorf-Gefäße
Scintillatorgefäße aus Polypropylen
Meßpipetten
Capilettor (Boehringer)

Geräte:
Packard TRI-CARB Liquid Scintillation Spectrometer Model 3380
β - Counter für DC-Platten

Beide Proben der markierten Substanzen wurden mit einem Toluol/Methanolgemisch (1:1 v/v) auf je 10 ml aufgefüllt. Die Gesamtaktivität in 10 ml Lösung betrug mithin
10 μCi = $2 \cdot 10^7$ cpm.
Im β -Counter rechnet man durchschnittlich mit einer Zählausbeute von 50 %, d.i. 10^7 cpm in 10 ml Lösung.

Bei einer Gesamtaktivität von 5000 bis 10000 cpm pro Probenansatz ist noch mit einer ausreichenden Präzision der Ergebnisse auf Grund der Zählstatistik zu rechnen, d.h. jeder Probe müssen 5 oder 10 µl der radioaktiven Lösung zugesetzt werden.

Vor Beginn der Untersuchung wurde die Reinheit des ^{14}C-Lecithins und ^{14}C-Sphingomyelins überprüft. Diese ist von der Herstellerfirma für Lecithin mit 99 % und für Sphingomyelin mit 98 % angegeben.

Auf einer 20 x 20 cm großen Kieselgelplatte (Merck) wurden strichförmig nebeneinander (je 2 cm breit) nicht markierter und mit ^{14}C-markierter Lecithin- und Sphingomyelin-Standard aufgetragen.

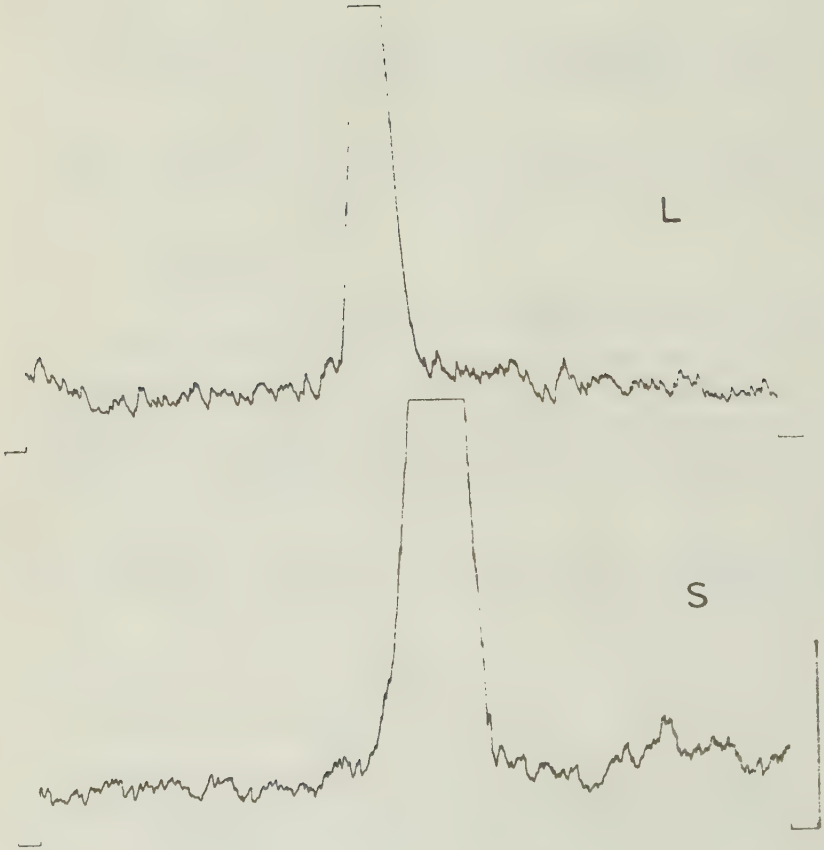
Die Entwicklung erfolgte in einem Tank, der mit 150 ml eines Gemischs aus $CHCl_3$, CH_3OH und H_2O (65:35:4, v:v:v) beschickt worden war.

Die Standards (Serva) lagen in 0,1 %iger Konzentration in einem Äthanol/Toluol-Gemisch (1:1, v:v) vor.

Nach Entwicklung der Platte wurden die Flecken mit Joddämpfen sichtbar gemacht und mit Bleistift markiert; anschließend wurde die Verteilung der β-Strahlungsaktivität auf der Platte mit einem β-Counter für DC-Platten untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 10 für Lecithin und Sphingomyelin wiedergegeben.

Durch diese Untersuchung konnte die Reinheit beider Substanzen bestätigt werden.

Abb. 8 Darstellung der Reinheit von ^{14}C-Lecithin und ^{14}C-Sphingomyelin



Erster Versuch:

Aktivitätsmessungen nach Acetonfällung im Präzipitat nach Zugabe von ^{14}C-markiertem Lecithin und Sphingomyelin zu einer Fruchtwasserprobe.

Durchführung:

a) Extraktion von 18 ml Fruchtwasser in 12 Portionen zu je 1,5 ml
b) Zugabe von je 5 µl ^{14}C-L und je ^{14}C-S zu je 6 Extrakten
c) Eindampfen der markierten Extrakte
d) Wiederaufnahme des Evaporates mit je 200 µl $CHCl_3$
e) weitere Aufteilung der Proben:
   Acetonpräzipitation der Hälfte der ^{14}C-L-markierten und der ^{14}C-S-markierten Lösungen nach der Methode Glucks, der anderen Hälfte nach der Methode Cochs
f) Eindampfen des Acetonpräzipitates und des -überstandes
g) Wiederaufnahme der Evaporate in je 200 µl $CHCl_3$
h) Überführen der Proben in die Scintillatorflüssigkeit durch dreimaliges Umschütten (10 ml Scintillatorflüssigkeit pro Probe und Flasche, Summe 24)

Dieser Versuch wurde in Reagenzgläsern aus Glas durchgeführt. Die Meßwerte sind der Tabelle XXI zu entnehmen.

Die Meßwerte in diesem Versuch zeigten erhebliche Schwankungen.
Als Tendenz zeichnete sich lediglich für die nach Coch präzipitierten Proben eine Abnahme der Zählausbeute für die Aceton-lösliche Fraktion ab, während im Gluck'schen Ansatz die Aceton-lösliche Fraktion zumeist höhere Werte aufweist.

Tabelle XXI Gemessene Aktivitäten von ^{14}C-L und ^{14}C-S im Acetonpräzipitat und -überstand

	Acet.präz.	Acet.lösl.	Σ	Acet.präz.	Acet.lösl.	Σ
	5.005,0 49,4 %	5.127,5 50,6 %	10.132,5	3.277,0 26,8 %	8.939,5 73,2 %	12.216,5
Gluck	4.760,0 44,4 %	5.974,0 55,6 %	10.734,0	2.232,5 18,4 %	9.922,5 81,6 %	12.155,0
	3.739,5 33,3 %	7.502,5 66,7 %	11.242,0	2.472,5 29,0 %	6.053,0 71,0 %	8.525,5
	6.924,0 66,4 %	3.506,5 33,6 %	10.430,5	7.080,5 57,3 %	5.287,0 42,7 %	12.367,5
Coch	8.322,5 74,9 %	2.793,0 25,1 %	11.115,5	11.074,0 81,5 %	2.512,5 18,5 %	13.586,5
	8.179,0 68,3 %	3.805,0 31,7 %	11.984,0	5.867,5 51,6 %	5.511,5 48,4 %	11.379,0
	^{14}C-L			^{14}C-S		

Zweiter Versuch:

Aufgrund der starken Schwankungen des präzipitierten Anteils an zugesetztem ^{14}C-Lecithin bzw. ^{14}C-Sphingomyelin wurde der erste Versuch wiederholt; die radioaktiven Standards wurden jedoch nicht im Fruchtwasser, sondern in Chloroform gelöst.

Dabei zeigte sich ein auffälliger Aktivitätsverlust; die gemessene Gesamtaktivität mancher Proben betrug weniger als 1 % der zugesetzten Aktivität.

Dritter Versuch:

Um die Präzision des Präzipitationsschrittes und die Schwankungen des Aktivitätsverlustes zu quantifizieren, wurde der zweite Versuch als 10-fach Bestimmung wiederholt.

Die Ergebnisse finden sich in Tabelle XXII.

Es zeigten sich wieder außerordentlich starke Schwankungen in der insgesamt wiedergefundenen Aktivität.

Um zu klären, ob die restliche Aktivität an der Gläschenoberfläche haftet, wurden diese mit Chloroform und Äthanol sowie mit Scintillatorflüssigkeit mehrfach gespült. In der Spülflüssigkeit fand sich jedoch keine über den Leerwert hinausgehende Aktivität.

Aufgrund dieser Versuche war eine Aussage über die Acetonpräzipitation unmöglich. Zunächst mußte daher das Verschwinden der ^{14}C-Aktivität geklärt werden.

Um zu überprüfen, an welcher Stelle in der Verarbeitung des ^{14}C-L und des ^{14}C-S der Aktivitätsverlust auftrat und wodurch er bedingt war, wurde folgender Versuch angesetzt.

Vierter Versuch:

Einfluß der Verarbeitung der markierten Substanzen auf die meßbaren ^{14}C-Aktivitäten.

Proben: 10 µl ^{14}C-L bzw. ^{14}C-S in 200 µl $CHCl_3$

Arbeitsschritte:

1) Gemisch direkt durch Umspülen in Scintillator überführt
2) Gemisch zur Trockne eingedampft, das Evaporat mit Scintillatorflüssigkeit ausgespült

Tabelle XXII Gemessene Aktivitäten von ^{14}C-L und ^{14}C-S in $CHCl_3$ nach Acetonpräzipitation im 10-fach Ansatz - Messung in beiden Fraktionen -

^{14}C-S	Acet.präz.	Acet.lösl.	Σ	^{14}C-L	Acet.präz.	Acet.lösl.	Σ
69,5	20,6 %	268,0 79,4 %	337,5	133,0	55,5 %	106,5 44,5 %	239,5
65,0	30,6 %	147,5 69,4 %	212,5	372,0	56,5 %	286,5 43,5 %	658,5
123,5	51,7 %	115,5 48,3 %	239,0	60,5	62,1 %	37,0 37,9 %	97,5
58,0	56,0 %	45,5 44,0 %	103,5	3.524,0	35,9 %	6.304,5 64,1 %	9.828,5
203,5	12,8 %	1.391,0 87,2 %	1.594,5	122,0	70,9 %	50,0 29,1 %	172,0
215,5	27,1 %	280,0 35,2 %	795,5	2.637,0	84,7 %	477,0 15,3 %	3.114,0
1.184,0	24,8 %	3.585,0 75,2 %	4.769,0	2.502,5	44,4 %	3.127,5 55,6 %	5.630,0
308,0	16,0 %	1.622,5 84,0 %	1.930,5	856,5	90,1	94,5 9,9 %	951,0
82,0	40,1 %	122,5 59,9 %	204,5	166,5	58,4 %	119,0 41,6 %	285,0
1.849,5	57,6 %	1.361,5 42,4 %	3.211,0	173,0	64,8 %	94,0 35,2 %	267,0

3) Gemisch evaporiert, mit 200 µl $CHCl_3$ aufgenommen und durch Ausspülen in die Scintillatorflaschen überführt
4) Gemisch mit 5 ml Aceton versetzt (4° C), nach Mischen eine Stunde lang bei -20° C gekühlt; anschließend wurden Präzipitat und Überstand zusammen eingedampft, mit 200 µl $CHCl_3$ aufgenommen und durch Umspülen in Scintillatorflaschen überführt.

Der Ansatz erfolgte jeweils dreifach. Die Meßwerte sind der Tabelle XXIII zu entnehmen.

Tabelle XXIII Aktivitätsmessungen von ^{14}C-L und ^{14}C-S in $CHCL_3$ nach verschiedenen Vorbereitungsschritten

		^{14}C-L	^{14}C-S
1)	^{14}C-L in 200 µl $CHCl_3$ in Scintillator	10.581,5	16.040,0
		11.239,0	17.546,5
		10.289,0	3.020,5
2)	^{14}C-L bzw. ^{14}C-S in 200 µl $CHCl_3$, Evaporat in Scintillator	5.066,5	30,5
		9.056,5	34,5
		3.563,5	39,0
3)	wie oben Evaporat in 200 µl $CHCl_3$ aufgenommen, dann in Scintillator	3.225,0	8.756,5
		8.557,0	2.992,0
		10.836,0	14.896,0
4)	wie oben Acetonpräzipitation, vollständiges Eindampfen, dann wie 3)	2.204,5	21.808,5
		1.752,0	11.046,0
		4.578,0	28.978,5

Die Streuung der Werte war so groß, daß sich daraus kein Hinweis gewinnen ließ, an welcher Stelle der große Aktivitätsverlust eintrat.

In allen Fällen waren jedoch die gleichen Reagenzgläser aus Glas verwendet worden.

In einem weiteren Versuch wurde daher der Einfluß verschiedener Materialien auf die Ergebnisse untersucht.

Fünfter Versuch:

Vergleich verschiedener Verarbeitungsgefäße

Es wurden verglichen:

a) Reagenzgläser aus Glas mit Rundboden, 12 x 85 mm
b) Eppendorf-Reaktionsgefäße aus Polyäthylen, 1,5 ml
c) Scintillatorflaschen aus Polypropylen, 10 ml

Probe: 10 µl ^{14}C-Lecithin in 200 µl $CHCl_3$

Von einem 6-fach Ansatz wurden jeweils 3 Proben unter N_2 zur Trockne eingedampft, 3 an der Luft trocknen gelassen.

Die Ausgangsproben wurden jeweils direkt in ein Eppendorf-Polypropylen- oder Glasgefäß pipettiert, darin evaporiert bzw. luftgetrocknet und nach Zugabe von 200 ul $CHCl_3$ durch Ausspülen bzw. Zuführung des Scintillator in die Scintillatorflüssigkeit überführt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle XXIV zusammengefaßt.

Tabelle XXIV Aktivitätsmessungen von ^{14}C-L in verschiedenen Reaktionsgefäßen

^{14}C-Lecithin	unter N_2 evaporiert	an der Luft getrocknet	
Eppendorf-Gefäße	19.865	20.874	
	18.903	20.643	
	18.813	21.511	^{14}C-Lecithin Standard
Polypropylen-Flaschen	20.493	22.041	
	21.467	21.314	23.686 cpm
	21.261	22.470	24.001 cpm
Glasreagenz-röhrchen	5.164	4.875	
	3.314	4.985	
	3.249	4.737	

Zum Vergleich ergaben 10 µl ^{14}C-Lecithin, direkt in den Scintillator pipettiert, Aktivitäten von 23.686 und 24.001 cpm.

Folgende Rückschlüsse lassen sich aus dem Ergebnis dieses Versuches ziehen:

a) Der weitaus größte Teil der Aktivität bleibt im Glasröhrchen zurück. Er läßt sich auch mit organischen Lösungsmitteln - wie mehrfach versucht wurde - nicht herauslösen.
b) Der zurückbleibende Anteil ist nicht konstant. Wie aus früheren Versuchen erkennbar, zeigen die in der Scintillatorflüssigkeit gemessenen Aktivitäten eine große Variationsbreite. Die Ursache dafür ist nicht eindeutig.
c) Die gemessenen Aktivitäten liegen niedriger, wenn die Probe unter N_2 eingedampft wird. Der Verlust beträgt etwa 5 - 10 %.

Für die weiteren Versuche ersetzten wir daher die Glasröhrchen durch Polypropylen- bzw. Polystyrolreagenzgläser.

Es wurde nun erneut versucht, das Verhalten von ^{14}C-Lecithin und ^{14}C-Sphingomyelin bei der Acetonpräzipitation zu untersuchen.

Sechster Versuch:
Überprüfung des Verhaltens von ^{14}C-L und ^{14}C-S in $CHCl_3$ im Aceton-Präzipitationsschritt (nach Coch).
Der Versuch wurde als 10-fach Bestimmung durchgeführt.

Arbeitsschritte:
1) Verdünnen von 10 µl ^{14}C-L bzw. ^{14}C-S mit 200 µl $CHCl_3$
2) Mischen, Zugabe von 5 ml kaltem Aceton (4^o)
3) Mischen, kühlen (eine Stunde bei -20^o)
4) Zentrifugieren, Überstand abdekantieren
5) Überstand und Präzipitat evaporieren und mit 200 µl $CHCl_3$ aufnehmen
6) durch Umschütten in Scintillatorgefäße überführen

Die Meßwerte sind aus der Tabelle XXV zu entnehmen.

Tabelle XXV Aktivitätsmessungen von ^{14}C-Lecithin und -Sphingomyelin in $CHCl_3$ nach Acetonpräzipitation

Durchführung des Versuches in Polypropylen-reagenzgläsern

^{14}C-Lecithin	Aceton-präzipitat	Aceton löslich	Σ	Aceton-lösl. / Aceton-präz.
	2.735	[14.214]		
Standard	3.470	[14.227]		
23.648 cpm	1.989	19.708	21.697	9,90
23.532 cpm	2.228	19.670	21.898	8,82
	3.164	18.478	21.642	5,84
	3.829	16.408	20.237	4,28
	4.105	16.645	20.750	4,05
	3.260	16.962	20.222	5,20
	1.899	19.418	21.317	10,22
	2.598	19.024	21.622	7,32
	29.277	146.313	169.385	55,72
	$\bar{x}$ =2.928	$\bar{x}$ =18.289	$\bar{x}$ =21.173	$\bar{x}$ =6,96
	s = 763	s = 1.401	s = 676	s =2,47
	V%=26,05	V%= 7,66	V%= 3,19	V%=35,48
^{14}C-Sphingo-myelin	1.316	[12.041]		
	1.047	[13.340]		
	1.124	20.285	21.409	18,04
Standard	1.227	20.452	21.679	16,66
26.827 cpm	1.132	22.577	23.709	19,94
26.963 cpm	1.040	23.124	24.164	22,23
	1.571	19.578	21.149	12,46
	1.213	22.239	23.452	18,33
	1.940	19.009	20.949	9,79
	1.284	20.026	21.310	15,59
	12.894	167.290	177.821	133,04
	$\bar{x}$ =1.289	$\bar{x}$ =20.911	$\bar{x}$ =22.228	$\bar{x}$ =16,63
	s = 276	s = 1.521	s = 1.312	s = 4,0
	V%=21,42	V%= 7,27	V%= 5,90	V%= 24

Kommentar zu den Ergebnissen:

a) Die Summe der Aktivitäten in Aceton-löslicher und -unlöslicher Fraktion von ^{14}C-L und ^{14}C-S war relativ konstant; bei einem Mittelwert von 22.000 für Lecithin und 22.500 für Sphingomyelin war V% kleiner als 6 %.

b) Das Verhältnis von Aceton-löslicher zu Aceton-präzipitierter Fraktion streute von 4,05 bis 10,22.
(Ursache zu niedriger Rationes mag nicht vollständiges Abdekantieren des Überstandes sein.) Es läßt sich jedoch eindeutig sagen, daß Dipalmityllecithin nicht vollständig präzipitiert wird, sondern im Gegenteil der größere Teil, nämlich 75 - 90 % löslich ist.

c) Für ^{14}C-Sphingomyelin gilt Ähnliches:
Das Verhältnis von Aceton-löslichem zu Aceton-unlöslichem Sphingomyelin variiert von 9,79 bis 19,94 wiederum in Abhängigkeit von der Vollständigkeit des Abdekantierens, das einen nicht unbedeutenden Einflußfaktor in diesem ganzen Schritt darstellt.

d) Nur ein geringer Anteil des ^{14}C-S wird präzipitiert, nämlich nur 5 - 10 %. Das bedeutet im Rahmen der Aceton-Präzipitation einen gravierenden Konzentrationsverlust.

e) Der Aktivitätsverlust der Summen gegenüber dem direkt gemessenen Standard ist im Vergleich zu den vorherigen Versuchen gering, nämlich im Mittel 10,2 % beim Lecithin und 17,3 % beim Sphingomyelin.

f) Ein weiteres Phänomen wurde in diesem Versuch sichtbar. Bei 2 Proben jeder Fraktion war der Acetonüberstand nicht evaporiert, sondern direkt in den Scintillator überführt worden. Damit ging für ^{14}C-S ein Aktivitätsverlust von 30 - 40 %, für ^{14}C-L von 25 - 30 % einher.

In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob dieser Aktivitätsverlust volumenabhängig ist (5 ml Aceton + 10 ml Scintillatorflüssigkeit) oder ob das Aceton (gut mischbar mit dem Scintillator) die Ursache darstellt.

Siebter Versuch:

Einfluß des Volumens der Scintillatorflüssigkeit oder des Acetons auf die Aktivität

a) 10 µl ^{14}C-L direkt in 10 ml Scintillator pipettiert
b) 10 µl ^{14}C-L direkt in 15 ml Scintillator pipettiert
c) 10 µl ^{14}C-L in 200 µl $CHCl_3$ gelöst, Zugabe von 5 ml Aceton, in 10 ml Scintillator überführt.

Der Versuch wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eindeutig, daß der Aktivitätsverlust auf Kosten des Acetonzusatzes geht, der nicht evaporiert wurde. In einem weiteren Versuch wurde das Verhalten von ^{14}C-L und ^{14}C-S bei der Acetonpräzipitation in einer Fruchtwasserprobe überprüft.

Achter Versuch:

a) Extraktion von 1,5 ml Fruchtwasser
b) Zugabe von je 10 µl ^{14}C-L bzw. ^{14}C-S
c) Eindampfen der markierten Extrakte
d) Wiederaufnahme in 200 µl $CHCl_3$
e) Acetonpräzipitation nach der Methode Cochs
f) Eindampfen von Acetonpräzipitat und -überstand
g) Wiederaufnahme in 200 µl $CHCl_3$
h) Überführen der Proben in die Scintillatorflüssigkeit

Die Meßwerte sind in Tabelle XXVI wiedergegeben.

Das Verhältnis von Aceton-löslichem zu Aceton-präzipitiertem ^{14}C-L und ^{14}C-S nimmt ab, wenn die markierten Substanzen nicht in einer Chloroformlösung, sondern im Fruchtwasserextrakt der Acetonpräzipitation zugeführt werden.

Die in Aceton-unlösliche Fraktion beträgt dann etwa 30 %.

Jedoch kann auch in diesem Fall festgestellt werden, daß Dipalmityllecithin zum größeren Teil durch Aceton nicht präzipitiert wird.

Tabelle XXVI Aktivitäten von ^{14}C-Lecithin und -Sphingomyelin in Acetonpräzipitat und -überstand einer Fruchtwasserprobe

	Aceton-präz.		Aceton-lösl.		Aceton lösl. / Aceton präz.	
^{14}C-L	7.504	s = 406	17.673	s = 1.102	2,35	s = 0,29
	7.504	V% = 5,59	16.929	V% = 6,15	2,25	V% = 11,88
	6.800		19.095		2,80	
^{14}C-S	8.974	s = 506	18.620	s = 551	2,07	s = 0,20
	8.884	V% = 5,86	18.811	V% = 2,89	2,11	V% = 8,96
	8.056		19.655		2,43	

4.9. Versuche der Qualitätskontrolle

Die Überprüfung der Präzision von Tag zu Tag und der Richtigkeit mit den Methoden der statistischen Qualitätskontrolle, die im klinisch-chemischen Laboratorium für Routinebestimmungen inzwischen üblich geworden ist, wurde für die L/S-Ratio bisher nicht beschrieben.

Da käufliche Proben für diese Überprüfung nicht zur Verfügung stehen, versuchten wir zu ermitteln, ob eingefrorenes oder lyophilisiertes Fruchtwasser als Präzisionskontrollprobe geeignet ist.

Dazu mußte gezeigt werden, ob sich durch Einfrieren oder Lyophilisieren des Fruchtwassers Änderungen der L/S-Ratio nachweisen lassen.
Solche Änderungen sind möglich

a) durch chemische oder enzymatische Zersetzungsprozesse im Fruchtwasser, die sich auf die Phospholipidkonzentrationen auswirken
b) durch veränderte Eigenschaften bei der Extraktion und weiteren Verarbeitung
c) durch Unterschiede im Auftrennungsverhalten.

Versuchsanordnung:

a) Zentrifugation des frischen Fruchtwassers innerhalb von 1-4 Stunden nach Gewinnung.
b) Teilung in 3 Fraktionen:
   1. einfrieren bei -18^{o}
   2. gefriertrocknen (lyophilisieren) einer genau definierten Fruchtwassermenge
   3. sofortige Extraktion und Weiterverarbeitung nach spätestens 6 - 12 Stunden (nach Kühlung bei $+4^{o}$)
c) Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen in Kapitel 4.8 wurde auf die Acetonpräzipitation verzichtet.
d) Die Aufarbeitung erfolgte nach der Standardarbeitsanleitung (s. Seite 51/52).
e) Als Standards wurden eine 2:1 und 3:1 Mischung hergestellt.
f) Als Proben wurde Fruchtwasser verschiedener Herkunft und "Reife" verwendet:

A FW (Punktion bei Sectio) 40.SSW
B FW (Punktion bei Sectio) 40.SSW
C FW (Amniocentese) 35.SSW
D FW (Amniocentese) 32.SSW

Die Verarbeitung der gefrorenen und gefriergetrockneten Proben erfolgte nach 2-4 Wochen, und zwar wie das frische Fruchtwasser der Arbeitsanleitung entsprechend unter Auslassung der Acetonpräzipitation.

Die Meßwerte sind der Tabelle XXVII zu entnehmen.

Das mit "D" bezeichnete Fruchtwasser, das aus der 32. Schwangerschaftswoche stammte und durch Amniocentese gewonnen wurde, spiegelt eindeutig die fetale Lungenunreife wider.

Durch die Behandlung des Tieffrierens bzw. Lyophilisierens kommt es zu einem Konzentrationsverlust beider Lipidfraktionen, der sich aber prozentual stärker auf die densitometrische Auswertung des Sphingomyelinfleckes auswirkt und somit in einem höheren Quotienten L:S resultiert. Diese Beobachtung wird gestützt durch die Meßwerte in der Tabelle XXVII, die zeigen, daß die L/S-Ratio des frischen Fruchtwassers niedriger liegt als die des tiefgefrorenen bzw. des lyophilisierten Fruchtwassers. Im Vergleich der beiden letzten wurden bei der tiefgefrorenen Probe einheitlich geringfügig höhere Meßwerte beobachtet als bei der gefriergetrockneten Probe.

In der optischen Überprüfung der Trenneigenschaften der drei verschiedenen Proben konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Aus der erheblichen Differenz der Meßwerte geht jedoch hervor, daß das Fruchtwasser durch Methoden der Haltbarmachung wie Tiefgefrieren oder Gefriertrocknen eine Änderung in den Konzentrationsverhältnissen der Phospholipide erfährt, die den Gebrauch von gefrorenem oder lyophilisiertem Fruchtwasser als Kontrollprobe nicht empfehlenswert erscheinen lassen.

Tabelle XXVII Vergleichende Meßwerte 4 verschiedener Fruchtwasserproben, Verarbeitung im frischen Zustand, nach Tiefgefrieren und Lyophilisieren

	frisch	tiefgefroren	lyophilisiert
FW A	4,1 / 4,2	12,3 / 12,5[1)]	11,8 / 11,0
Standard 2:1	1,37 / 1,37	1,75 / 1,86	1,74 / 1,70
Standard 3:1	2,10 / 2,0	2,36 / 2,40	2,40 / 2,48
FW B	3,0 2,97 3,40 3,09 3,07 3,45	5,22 4,90 5,26 4,89	4,96 4,48 5,21 4,75
Standard 2:1	1,85 1,83 1,88 1,84	1,85 1,90 1,89 1,88	
Standard 3:1	2,04 2,20 2,07 2,20	2,55 2,61	
FW C	2,35 3,70[1)] 2,38 3,52	4,71 / 4,50	4,31 / 4,10
Standard 2:1	1,5 / 1,6	1,90 / 1,92	1,73 / 1,68
Standard 3:1	1,98 / 2,10	2,48 / 2,50	2,61 / 2,65
FW C	0,50 0,63 0,50 0,61	0,67 / 0,66	0,68 / 0,65
Standard 2:1	1,43 1,57 1,55 1,63	1,83 2,0 1,89 1,92	
Standard 3:1	1,98 2,20 1,98 2,15	2,40 2,55 2,48 2,61	

1) Sphingomyelin-Fleck kaum sichtbar

5. Diskussion

Zur Vorhersage der fetalen Lungenreife aus einer durch Amniocentese gewonnenen Fruchtwasserprobe sind eine Reihe physikalischer und klinisch-chemischer Untersuchungsmethoden vorgeschlagen worden:

a) Dünnschichtchromatographische Auftrennung - Anfärbung und Auswertung (Densitometrie, Planimetrie) → Bestimmung der L/S-Ratio.

b) Dünnschichtchromatographische Auftrennung - Anfärbung, Abkratzen und Gravimetrie → Bestimmung der L/S-Ratio.

c) Chromatographische Auftrennung - Anfärbung, Abkratzen - Phosphorbestimmung → Berechnung der Lecithinkonzentration.

d) Dünnschichtchromatographische Auftrennung - Anfärbung, Abkratzen - Phosphorbestimmung → Berechnung der gesamten Phospholipidkonzentration.

e) "Bubble-Test" oder "Rapid-Foam-Test" in verschiedenen Verdünnungsstufen.

f) Bestimmung des Fettsäuregehaltes (C_{16}) durch Gaschromatographie.

g) Bestimmung der P/S-Ratio (Palmitinsäure/Stearinsäure) durch Gaschromatographie.

h) Bestimmung des Phosphatidylglyceringehaltes.

Eine kritische Sichtung der Methoden und ihres Für und Wider - wie es sich in der Literatur widerspiegelt - zeigt, daß besonders zwei Methoden für die Bestimmung der fetalen Lungenreife Bedeutung erlangt haben:
Erstens die Bestimmung der Lecithinkonzentration im Fruchtwasser, wie sie von Bhagwanani durchgeführt und proklamiert worden ist, zweitens die Bestimmung des Verhältnisses von Lecithin und Sphingomyelin, der sogenannten L/S-Ratio.

Die Bestimmung der Lecithinkonzentration scheint analytisch im allgemeinen zuverlässig durchführbar zu sein, Bhagwanani gibt einen Grenzwert von 3,5 mg/dl an, unterhalb dessen mit

dem Auftreten eines hyalinen Membransyndroms zu rechnen ist. Theoretische Überlegungen über die Bedeutung des Lecithins als Hauptbestandteil des "Surfactant" lassen es jedoch wahrscheinlich erscheinen, daß nicht die Lecithinkonzentration, sondern die Gesamtmenge des im Fruchtwasser befindlichen Lecithins mit dem Auftreten eines hyalinen Membransyndroms in Zusammenhang steht. Eine Interpretation der Lecithinkonzentration ist deshalb nur dann möglich, wenn - jeweils für die einzelnen Schwangerschaftswochen - das Fruchtwasservolumen bei der ungestörten und der pathologischen Schwangerschaft eine relativ konstante Größe darstellt. Es ist jedoch bekannt, daß gerade bei Risikoschwangerschaften die Häufigkeit von Poly- oder Oligohydramnien signifikant höher liegt als in der normalen Schwangerschaft. Damit wird aber die Beurteilung der Lecithinkonzentration gerade in Fällen, in denen sie von besonderer Bedeutung ist, wie zum Beispiel bei Rhesus-Inkompatibilität oder Eklampsie, unzuverlässig oder nicht mehr verwertbar.

Auf Grund eigener Untersuchungen spricht Falconer von einer geringen Beeinflussung der prognostischen Zuverlässigkeit der Lecithinkonzentration durch schwankendes Fruchtwasservolumen. Er unterstützt die Aussagen Bhagwananis, daß sich das Fruchtwasservolumen bei komplizierten Schwangerschaften nicht wesentlich von dem bei normalen Schwangerschaften unterscheidet. Es wird jedoch eingeräumt, daß bereits bei der normalen Schwangerschaft sich die Schwankungsbreite des Fruchtwasservolumens mit zunehmender Schwangerschaftsdauer deutlich erhöht.
Falconer schlägt für Grenzfälle die Bestimmung des Gesamtgehaltes von Lecithin im Amnionsack als zusätzlichen Parameter vor und gibt als unteren Grenzwert 20 mg Lecithin pro Amnionsack an. Die dazu notwendige Bestimmung des Fruchtwasservolumens ist jedoch aufwendig und schränkt die Praktikabilität dieser Methode drastisch ein.

Besonders wegen ihrer einfachen Durchführbarkeit hat deshalb die Bestimmung der L/S-Ratio für die Vorhersage der fetalen Lungenreife die größte Bedeutung erlangt.
Unter der Annahme, daß die Sphingomyelinmenge im Amnionsack relativ konstant ist, spiegelt eine Veränderung der L/S-Ratio lediglich eine Änderung der Lecithinmenge im Fruchtwasser

wider; die L/S-Ratio ist also eine vom Fruchtwasservolumen unabhängige Größe.
Dem theoretischen Vorteil dieser Methode stehen jedoch analytische Probleme gegenüber. Für die Bestimmung der L/S-Ratio im Fruchtwasser ist eine ganze Reihe von Methoden vorgeschlagen worden, die sich im analytischen Prinzip sehr ähnlich sind, sich in den Details jedoch zum Teil gravierend voneinander unterscheiden. Bereits diese - bei der Durchsicht der Literatur erkennbare - Tatsache läßt den Verdacht aufkommen, daß keine der vorgeschlagenen Methoden analytisch wirklich befriedigend ist.
Eine weitere Tatsache ist bedeutsam: Während bei klinisch-chemischen Routineanalysen die Überwachung von Präzision und Richtigkeit seit mehreren Jahren üblich ist und vom Gesetzgeber verlangt wird, ist diese für eine so komplizierte und in einigen Teilschritten kaum überschaubare Methode wie die Bestimmung der L/S-Ratio bisher wenig beschrieben worden. Dies hat nicht nur zur Folge, daß Unsicherheiten über die Richtigkeit eines einmal bestimmten Wertes bestehen, sondern wegen fehlender Angaben über die Präzision von Tag zu Tag ist es auch nicht möglich, zu beurteilen, ob die Werte für die L/S-Ratio von zwei Fruchtwasserproben, die im Abstand von einer Woche gewonnen wurden, signifikant voneinander verschieden sind oder nicht. Das heißt: die Dynamik der L/S-Ratio-Werte mit fortschreitender Schwangerschaft ist nur schwer zu interpretieren.

Bereits für die Zentrifugation, den ersten Arbeitsschritt der Aufarbeitung der Fruchtwasserprobe, finden sich keine einheitlichen Angaben. Auf der einen Seite scheint es klar, daß das Fruchtwasser zentrifugiert werden muß, da es im allgemeinen gröbere Verunreinigungen durch Vernixflocken enthält und trüb erscheint; andererseits wurde mehrfach in der Literatur beschrieben, daß es durch Änderung der Zentrifugationsbeschleunigung zu einem beträchtlichen Verlust an Lecithin (91 %) und Sphingomyelin (87 %) kommen kann.
Dieser Lipidverlust ist wahrscheinlich auf celluläre oder membrangebundene Bestandteile zurückzuführen, die bei höheren Zentrifugationsgeschwindigkeiten abzentrifugiert werden. Es

gehen jedoch annähernd gleiche Anteile von Lecithin und Sphingomyelin bei der Zentrifugation verloren, so daß es zu keiner quantitativen Änderung des Lecithin-Sphingomyelin-Verhältnisses kommt, sondern nur zu einer Verminderung der Gesamtkonzentration.
Ohne daß diese Literaturangaben durch eigene Versuche überprüft wurden, wählten wir mit einer Zentrifugationsbeschleunigung von 3000 g und einer Zentrifugationszeit von 5 Min. Bedingungen, bei denen zumindest der größte Teil der cellulären oder Membranbestandteile abzentrifugiert wird.
Ein weitaus schwierigeres und kontroverseres Problem stellt die Extraktion der Phospholipide aus dem Fruchtwasser dar. Phospholipide können in wässriger Lösung nicht nur in monomolekularer Form sondern mehr oder weniger stark in Form von Micellen vorliegen, welches einen erheblichen Einfluß auf ihre Extraktionsfähigkeit hat; hier können bereits geringe methodische Varianten das Ergebnis außerordentlich stark beeinflussen.
In eigenen Versuchen wurden daher drei Modifikationen der Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Folch sowie eine Flüssig-Fest-Extraktion mit Hilfe käuflicher Säulen miteinander verglichen.

Die Flüssig-Fest-Extraktion - in der Literatur erwähnt bei Gluck (57,59,60) der mit DEAE-Cellulose gefüllte Säulen verwendete - zeigte keine Vorteile gegenüber der Flüssig-Flüssig-Extraktion. Durch die Größe der käuflichen Säulen wird viel Fruchtwasser benötigt (5 ml bei einer nur zu 2/3 gefüllten Säule), das in diesen Mengen nicht immer zur Verfügung steht. Außerdem entsteht ein relativ großes Volumen an organischem Lösungsmittel (etwa 15 ml), das mit Lipiden angereichert ist; dieses wiederum stellt ein Problem in der Verdampfung dar.
Weiterhin ist die Methode zeitaufwendiger bei gleichzeitig geringerer Lipidausbeute, was sich in niedrigeren Remissionswerten widerspiegelt.

Für die Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Folch (45, 46) bestehen viele Modifikationen, die sich sowohl in der quantitativen Zusammensetzung des Extraktionsmittels wie auch in Reihenfolge und Zahl der Extraktionsschritte unterscheiden. (s. Tab. II, Seite 25 Nelson (122, 123), Kiyasu (88), Gusdon (66), Blass (9))

Entscheidend für die Präzision der Extraktion ist die vollständige Phasentrennung. Badham (6) zeigte, daß die Präzision der Phospholipidmengen in Fruchtwasserextrakten schlechter war als in Extrakten reiner Lecithinlösungen, und er begründete dies durch unvollständige Phasentrennung im Fruchtwasserextrakt.

Als Einflußfaktoren auf die Phasentrennung gelten:

a) Menge und Verhältnis der gemischten Volumenanteile von Methanol, Chloroform und Fruchtwasser
b) Dichte und Volumen der Proteinzwischenschicht
c) Zentrifugationszeit und -geschwindigkeit
d) Waschung der organischen Phase mit destilliertem Wasser (66, 88)
e) Verwendung von Trocknungsmitteln
f) Zahl der durchgeführten Extraktionsschritte

In eigenen Versuchen zeigten sich folgende Ergebnisse, die sich größtenteils mit den Angaben der Literatur decken:

Die von Kiyasu (88) und Gusdon (66) angegebene Zugabe von Methanol im Überschuß (FW : CH_3OH = 1 : 2) führte zur Bildung von Koageln, deren Abzentrifugation zu einem Lipidverlust führen kann (niedrigere Remissionswerte).

Durch Waschen der Chloroformphase mit destilliertem Wasser (88, 66) erschien der Extrakt milchig trüb (Feuchtigkeit im organischen Lösungsmittel). Die klare Phasentrennung war dadurch erschwert, und eine geringere Lipidausbeute die Folge.

In eigenen Versuchen wurde die Methode nach Gusdon (66) durch Auslassung der Waschung mit destilliertem Wasser und Verwendung gleicher Volumina von Fruchtwasser und Methanol (v/v 1:1) modifiziert. Dadurch konnten oben genannte Fehlerquellen ausgeschlossen werden.

Die Zentrifugation stellt in eigenen Versuchen einen notwendigen Zwischenschritt bei der Extraktion dar (9, 6). Sie führte zur Bildung einer festgefügten zusammenhängenden Proteinschicht, die sich mit der Pasteurpipette gut durchstoßen ließ, während die Schicht bei Verwendung der Methode nach Gusdon (66) locker gefügt war, sich bei Berührung in Flöckchen auflöste und die organische Chloroformschicht durchsetzte.

Die mehrfache Extraktion mit Vereinigung der getrennt gewonnenen Chloroform-Phasen führte nicht zu einer höheren Lipidausbeute (6) und wurde darum nicht in die Standardarbeitstechnik aufgenommen.

Die Methode nach Blass (9) stellte nach unseren Untersuchungen aufgrund ihrer einfachen Durchführung und vergleichsweise höchsten Lipidausbeute die Methode der Wahl dar.

Die Auftrennung der Phospholipide auf selbst hergestellten Kieselgel-Platten führte nicht immer zu reproduzierbaren Ergebnissen; so zeigten sich Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Fraktionen, ohne daß dafür ein Grund zunächst erkennbar gewesen wäre. Arbeitstechnik und Reagentien waren nicht verändert worden. Es zeigte sich, daß bei größerer Wanderungsgeschwindigkeit die Schärfe der Trennung zwischen den einzelnen Phospholipidfraktionen vermindert war. Dies führte zu einer Verschlechterung der Präzision bei der Bestimmung der L/S-Ratio. Konstanten chromatographischen Verhältnissen kommt daher eine große Bedeutung zu. Als wichtigster Faktor, der Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit hat, konnte die Qualität des Kieselgels erkannt werden. Auch wenn vorher gereinigtes Kieselgel zur Herstellung der Dünnschicht-Platten verwendet wird, ändert die verwendete Kieselgel-Chloroform-Suspension nach einigen Tagen ihre Eigenschaften, möglicherweise durch Aufnahme von Wasser. Bei veränderter Wanderungsgeschwindigkeit muß daher eine neue Kieselgel-Suspension angesetzt werden. Allerdings sind auch bei Gebrauch von frisch angesetzter Kieselgel-Suspension die Wanderungsgeschwindigkeit und die Schärfe der Trennung nicht völlig konstant. Die Gründe dafür konnten durch eigene Versuche nicht eindeutig geklärt werden; es scheint jedoch, daß Luftfeuchtigkeit und Temperatur eine Rolle spielen.
Aus der Literatur sind dazu lediglich die Versuche von Verhoeven (175) bekannt, der einen Einfluß der Luftfeuchtigkeit auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Lipide, ihre Trennung, Fleckengröße und Farbintensität nach Behandlung mit bestimmten Farbreagentien beobachtete.
Die dadurch hervorgerufenen Schwankungen der Ergebnisse gehen jedoch im allgemeinen nicht über den Vertrauensbereich der Methode hinaus, und die Ergebnisse bleiben auswertbar.

Auch bei der Visualisierung der getrennten Phospholipide findet sich in der Literatur eine große methodische Vielfalt; neben der Verwendung unterschiedlichster Farbstoffe kommt der Schwärzung der Phospholipide durch Schwefelsäure oder durch Ammoniumsulfat eine besondere Bedeutung zu. Die Verwendung von Farbstoffen zur Anfärbung der Phospholipide ist zwar im allgemeinen technisch einfacher, dem stehen jedoch Probleme bei der Haltbarkeit der Anfärbung und der Linearität zwischen Farbtiefe und Phospholipidkonzentration gegenüber. Gluck verwendete in seiner Standardarbeitstechnik zur Sichtbarmachung 50 %ige Schwefelsäure in Form eines Sprühreagenzes; dabei besteht jedoch die Gefahr, daß die Phospholipide nicht nur zu elementarem Kohlenstoff sondern teilweise zu flüchtigem CO und CO_2 oxidiert werden, woraus eine Verminderung der Schwärzungsintensität folgt. Dieser Gefahr kann man durch die Verwendung von 10 %iger Schwefelsäure in Form eines Sprühreagenzes entgehen; dabei ergibt sich bei optimaler Arbeitstechnik eine gute lineare Korrelation zwischen eingewogener Lipidmenge und densitometrischen Meßdaten.

Die Ergebnisse sind allerdings von der Beachtung einiger Details beim Aufsprühen der Schwefelsäure abhängig; so spielen die Neigung der Plättchen, die Sprühentfernung, die Sprühdauer und die Homogenität des Sprühnebels eine entscheidende Rolle.

Da für das Arbeiten mit einem Schwefelsäure-Sprühnebel ein spezieller Abzug zur Verfügung stehen muß, ist die Verwendung von Ammoniumsulfatlösung als Schwärzungsmittel von großem Interesse.

Eigene Versuche mit einer 5%igen Ammoniumsulfatlösung zeigten folgende Ergebnisse: 1. Es ist nicht möglich, der Kieselgel-Chloroform-Suspension Ammoniumsulfat beizumischen und somit das Ammoniumsulfat bereits bei der Herstellung der Platten homogen in der Kieselgelschicht zu verteilen. 2. Die aufsteigende Chromatographie mit 5 %iger Ammoniumsulfatlösung im Anschluß an die chromatographische Trennung der Phospholipide führt zu einer verminderten Trennschärfe der Lipidflecken. 3. Entscheidend ist jedoch, daß Lecithin bei der Verwendung von Ammoniumsulfat deutlich weniger angefärbt wird als bei der Verwendung von Schwefelsäure, während sich dies beim Sphingomyelin kaum bemerkbar macht.

Ermittelt man die L/S-Ratio einer Fruchtwasserprobe direkt aus den Remissionswerten des Lecithin- und Sphingomyelin-Flecks, so ergeben sich bei der Verwendung von Ammoniumsulfat als Schwärzungsmittel deutlich geringere L/S-Ratio-Werte als bei der Verwendung von Schwefelsäure. Verwendet man bei der Berechnung der Ergebnisse eine Eichkurve, so zeigt sich, daß durch die sehr viel flacher verlaufende Eichkurve die Präzision der L/S-Ratio-Bestimmung besonders bei niedrigen Werten deutlich vermindert ist. Die Beobachtung der geringeren Schwärzung des Lecithins bei der Verwendung von Ammoniumsulfat wurde in der Literatur mit verschiedenen Begründungen mehrfach kontrovers diskutiert (siehe Seite 57). Nach Gluck und Kulovich entspricht einer gravimetrisch bestimmten L/S-Ratio von 4 bei Verwendung von Ammoniumsulfat eine densitometrisch gemessene L/S-Ratio von 2, nach Gebhardt entspricht eine gravimetrisch bestimmte L/S-Ratio von 1,8 einer densitometrisch gemessenen L/S-Ratio von 1,2. Bei unseren eigenen Versuchen sind die Verhältnisse noch ungünstiger; einer durch Einwaage bestimmten L/S-Ratio von 3,0 entspricht eine densitometrisch bestimmte von 0,55, einer durch Einwaage bestimmten L/S-Ratio von 4,0 eine densitometrisch bestimmte von etwa 0,8. Durch Verwendung höher konzentrierter Ammoniumsulfatlösungen ließen sich die ungünstigen Verhältnisse zwar eindeutig, aber doch nur geringfügig verbessern; bei Verwendung von 30 %iger Ammoniumsulfatlösung entspricht einer eingewogenen L/S-Ratio von 3,0 eine densitometrisch bestimmte von 0,7, einer durch Einwaage bestimmten L/S-Ratio von 4,0 eine densitometrisch bestimmte von 0,9.

Es bleibt unverständlich, daß Gluck bei der Verwendung von Ammoniumsulfat als Färbemittel dieselben Eichkurven und dieselben Bewertungskriterien für die L/S-Ratio verwendet wie bei der Verwendung von Schwefelsäure; die kritische Grenze der L/S-Ratio bleibt unverändert bei einem Verhältnis von 2,0.

Es existieren mehrere Möglichkeiten, die angefärbten Lecithin- und Sphingomyelinflecke halbquantitativ oder quantitativ auszuwerten.

a) Visueller Vergleich der Fleckengröße und Farbintensität von Probe und Standard; gegebenenfalls wird der Mittelwert aus den Ergebnissen von drei Untersuchern ermittelt (151, 152)
b) Planimetrie (semiquantitativ)
   - mit Hilfe eines Gitters ("grid") (26)
   - Berechnung aus Länge und Breite des Fleckes (6, 11, 58)
   - Integration nach Ermittlung des Fleckumfanges (9)
c) Densitometrie (59, 174, 107, 95, 96)

Es ist unbestritten, daß die Zuverlässigkeit der Ergebnisse bei der Verwendung eines Densitometers zur Auswertung am größten ist (s. Tab. VI, S. 47); ein entsprechendes Gerät wurde deshalb auch für unsere Versuche verwendet. Dabei zeigte sich, daß bei zehnfacher Auswertung derselben Trennung der Variationskoeffizient zwischen 0,6 % (L/S-Ratio 1,0) und 2 % (L/S-Ratio 4,0) lag. Diese gute Präzision wurde bei der Analyse von Standardgemischen gewonnen und kann auf echte Fruchtwasserproben nicht ohne weiteres übertragen werden. Auch bei optimaler Arbeitstechnik ist die Trennung von Lecithin und Sphingomyelin aus einer Fruchtwasserprobe im allgemeinen schlechter als die Trennung der beiden Komponenten in einem Standardgemisch.

Besonders umstritten bei der Aufarbeitung der Fruchtwasserprobe ist die sogenannte Aceton-Präzipitation.

Dieser - besonders von Gluck (59) geforderte - Arbeitsschritt geht von der Voraussetzung aus, daß kaltes Aceton oberflächenaktives Lecithin - identisch mit DPPC - präzipitiert, während nicht oberflächenaktives Lecithin aufgrund seiner chemischen Struktur und Zusammensetzung in Lösung bleibt.
Bei einer L/S-Ratio im Übergangsbereich soll das Verhältnis von präzipitiertem Lecithin zu Gesamtlecithin als zusätzlicher Parameter zur Bestimmung der Lungenreife dienen.
Coch (26) unterstützt weitgehend die Meinung Glucks (59).
Verder (174) und Parkinson (136) vermuten eine unvollständige Wiedergewinnung von Sphingomyelin, was zu einer höheren L/S-Ratio nach Durchführung der Acetonpräzipitation führt.
Nach Meinung anderer Autoren (79) scheint die L/S-Ratio ohne

Acetonpräzipitation mehr dem Schwangerschaftsalter als der fetalen Lungenreife zu entsprechen.

Roux (151, 152) stellt den Wert der Acetonpräzipitation und ihre Beziehung zur Bestimmung der Lungenreife gänzlich in Frage: "Die in kaltem Aceton präzipitierte Lecithin-Fraktion ist weder lungenspezifisch noch oberflächenaktiv. Sie besteht auch nicht aus DPPC und stellt keinen Parameter der Lungenreife dar."

Über die Fettsäurezusammensetzung der präzipitierten und der Aceton-löslichen Fraktion bestehen ebenfalls gegensätzliche Aussagen (50, 171).

Die teilweise völlig kontroversen Ansichten über den Wert der Acetonpräzipitation für die richtige Bestimmung der L/S-Ratio sind erstaunlich; aus den Originalarbeiten der Autoren lassen sich nur wenige Informationen gewinnen, die die eine oder die andere These wahrscheinlicher machen. Generell jedoch läßt sich sagen, daß die Unterschiede in der Zusammensetzung - wenn sie überhaupt bestehen - zwischen alveolärem Lecithin, das weitgehend aus DPPC besteht, Lecithinen anderer Herkunft nicht so groß sind, daß ein so relativ einfaches Verfahren wie die Acetonpräzipitation eine auch nur annähernd vollständige Trennung erzielen wird.
In eigenen Versuchen fiel zunächst auf, daß es durch die Acetonpräzipitation zu einem beträchtlichen Verlust an Phospholipiden kam, der sowohl das Lecithin wie auch das Sphingomyelin betraf. Im allgemeinen wurden nach Acetonpräzipitation niedrigere Werte für die L/S-Ratio gemessen als ohne Acetonpräzipitation. Der Unterschied ist jedoch weder für frisches noch für blut-kontaminiertes Fruchtwasser quantifizierbar, da sich nach Durchführung der Acetonpräzipitation ein deutlicher Verlust an Präzision bemerkbar machte. Dieser Präzisionsverlust ist wohl auch der Grund für die Tatsache, daß die eigenen Versuche mit verschiedenen Modifikationen der Acetonpräzipitation kein eindeutiges Ergebnis erbrachten. Um den Einfluß der Acetonpräzipitation auf Lecithin und Sphingomyelin quantifizieren zu können, wurden deshalb verschiedenen Fruchtwasserproben 14-C-markiertes Di-Palmityl-Lecithin und -Sphingomyelin zugesetzt; beide Substanzen waren zuvor chromatographisch auf ihre Reinheit überprüft

worden. In mehreren Versuchen zeigte sich, daß das zugesetzte Di-Palmityl-Lecithin keinesfalls quantitativ präzipitiert wurde. Das Verhältnis der löslichen Fraktion zur unlöslichen Fraktion lag für ^{14}C-Lecithin zwischen 2,3 und 2,8 und für ^{14}C-Sphingomyelin zwischen 2,1 und 2,4. Mit diesem Versuch konnte daher die Auffassung Glucks, daß Di-Palmityl-Lecithin vollständig präzipitierbar sei, widerlegt werden. Da Di-Palmityl-Lecithin mit großer Wahrscheinlichkeit der entscheidende Bestandteil des Surfactant ist, stellt nach unseren Versuchen die Acetonpräzipitation keinen Verarbeitungsschritt dar, der zu einer reproduzierbaren Anreicherung der oberflächenaktiven Substanzen führt; die Beurteilung der Ergebnisse wird im Gegenteil durch den eingetretenen Präzisionsverlust der Methode wesentlich erschwert.

Das Verhältnis von Aceton-löslichem zu Aceton-unlöslichem Lecithin ändert sich, wenn die ^{14}C-markierten Substanzen nicht wie in den ersten Versuchen einem Fruchtwasserextrakt zugesetzt werden, sondern in Chloroform gelöst und anschließend präzipitiert werden. In diesem Fall sind 75 bis 90 % des zugesetzten Di-Palmityl-Lecithins und 90 bis 95 % des Sphingomyelins aceton-löslich; das bedeutet, daß die Acetonpräzipitierbarkeit von Lecithin und Sphingomyelin matrixabhängig ist. Über die Art der Matrixabhängigkeit existieren nur Spekulationen; so erscheint es möglich, daß die zugefügten radioaktiven Phospholipide beim Zusatz zu einem Fruchtwasserextrakt Wechselwirkungen mit anderen extrahierten Substanzen, z.B. Lipiden oder Lipoproteinen, eingehen, die die Präzipitierbarkeit beeinflussen. Zum anderen ist daran zu denken, daß Phospholipide in hohem Maße Micellen bilden, die sich gegenüber Extraktion und sonstigen Trennverfahren anders verhalten als monomolekulare Schichten oder gelöste Einzelmoleküle. Welche Faktoren diese Micellenbildung beeinflussen und welche Auswirkungen dies auf das Ergebnis hat, ist bisher nicht untersucht worden.

Die Untersuchungen mit radioaktiv markierten Phospholipiden führten zu einem weiteren, bislang nur von Falconer beschriebenen Befund.

Verwendete man bei der Aufarbeitung der Probe Reagenzgläser aus Glas, so kam es zu einem beträchtlichen, aber stark schwankenden Aktivitätsverlust, der zunächst unerklärlich schien. Beim Vergleich von Reagenzgefäßen aus Glas, Polyäthylen und Polypropylen zeigte sich, daß dieser sehr variable Aktivitätsverlust nur bei der Verwendung von Glasgefäßen auftrat. Unsere Versuche zeigen, daß es im Verlauf der Aufarbeitung der Probe zu Bindungen zwischen Lipiden und Glasoberfläche kommt, die auch durch organische Lösungsmittel nicht rückgängig zu machen sind. Wenngleich die Eigenschaften der extrahierten Fruchtwasserlipide und die der ^{14}C-markierten Phospholipide nicht völlig identisch sind, so läßt sich andererseits nicht ausschließen, daß sich die Fruchtwasserlipide gleich oder ähnlich verhalten. Auf Grund der Versuchsergebnisse wird daher vorgeschlagen, für die Aufarbeitung der Fruchtwasserproben keine Glasgefäße zu verwenden.

Für die Kontrolle von Präzision und Richtigkeit der L/S-Ratio-Bestimmung stehen keine käuflichen Kontrollproben zur Verfügung. Es wurde deshalb geprüft, ob Fruchtwasserproben durch Einfrieren oder Lyophilisieren haltbar gemacht und damit für eine statistische Qualitätskontrolle verwendet werden können. Es zeigte sich jedoch, daß sowohl das Tieffrieren wie das Lyophilisieren zu einem Konzentrationsverlust beider Lipidfraktionen führt. Dieser Verlust ist für Lecithin stärker als für Sphingomyelin, so daß die L/S-Ratio in eingefrorenen bzw. lyophilisierten Kontrollproben höher liegt. Wahrscheinlich entstehen beim Tieffrieren und Lyophilisieren Aggregate zwischen den Phospholipiden und anderen im Fruchtwasser vorhandenen Substanzen, z.B. Albumin, die andere Extraktionseigenschaften haben als die Phospholipide selbst. Ob durch eine Vorbehandlung der Fruchtwasserprobe diese Aggregatbildung verhindert werden kann und es damit nicht zu einer Änderung der L/S-Ratio durch Einfrieren oder Lyophilisieren kommt, oder ob ein lyophilisierter Fruchtwasserextrakt zur Qualitätskontrolle geeignet ist, wurde nicht überprüft.

Die Auswertung der eigenen Versuche findet ihren Niederschlag in der Aufstellung einer Standardarbeitstechnik, die auf

Seite 51/52 der vorliegenden Arbeit beschrieben ist. Routinemäßig ist eine Dreifachbestimmung der L/S-Ratio aus einer Fruchtwasserprobe zu empfehlen; für die Präzision der Methode kann dann ein Variationskoeffizient von 5,4 % angegeben werden.

6. Zusammenfassung

Die Bestimmung des Verhältnisses von Lecithin und Sphingomyelin im Fruchtwasser (L/S-Ratio) als Parameter der fetalen Lungenreife wurde kritisch überprüft.

Im theoretischen Teil der Arbeit kamen die gegensätzlichen Ansichten verschiedener Autoren über den "Surfactant" hinsichtlich seiner Synthese, Zusammensetzung, Gewinnung und Korrelation zur Lungenreife zur Darstellung.

Ferner wurde die große Vielfalt der analytischen Techniken bei der Bestimmung der L/S-Ratio aufgezeigt; es wurde versucht, die verschiedenen Arbeitstechniken anhand der von den Autoren publizierten Daten zu bewerten; dies war in vielen Fällen nur mit Einschränkungen möglich, da viele Arbeiten nach den Kriterien der Analytischen Chemie als lückenhaft betrachtet werden müssen.

Der praktische Teil der Arbeit konzentriert sich auf die Erarbeitung einer "Standardarbeitstechnik" zur Ermittlung der L/S-Ratio mit angebbarer Präzision und Richtigkeit.

Dabei erwies es sich als notwendig, besonders die Arbeitsschritte der Extraktion, der Acetonpräzipitation und der Anfärbung zu optimieren und nach Gründen für die schwankenden Ergebnisse bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung zu suchen.
Die Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde der Flüssig-Fest-Extraktion aufgrund einfacherer Durchführung, geringeren Bedarfs an Fruchtwasser bei gleichzeitig entsprechender bzw. besserer Präzision vorgezogen. Unter den verschiedenen Methoden der Flüssig-Flüssig-Extraktion zeigt die Methode nach Blass die besten Ergebnisse.

Die Acetonpräzipitation führte zu einer starken Konzentrationsabnahme der Phospholipide und wurde daraufhin in einer weiteren Untersuchung auf ihren Wert und ihre Wirkung überprüft. In einer Versuchsreihe unter Verwendung von ^{14}C-markiertem Lecithin und ^{14}C-markiertem Sphingomyelin zeigte sich, daß - entgegen dem Gluck'schen Postulat - Dipalmityl-Lecithin und Sphingomyelin nicht vollständig präzipitiert werden. Dabei war

die Präzipitierbarkeit der markierten Phospholipide zwar von der Probenmatrix und auch von der Arbeitstechnik abhängig, überschritt jedoch in keinem Fall einen Wert von 30 %.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Acetonpräzipitation aus der Standardarbeitstechnik eliminiert.

Als beste Anfärbung stellte sich die Sprühtechnik unter Verwendung von 10 %iger Schwefelsäure mit anschließender Veraschung und densitometrischer Auswertung heraus.

Schließlich wurde die Möglichkeit einer Qualitätskontrolle der L/S-Ratio-Bestimmung überprüft.

Das Fehlen käuflicher Kontrollproben machte die Herstellung eigener Kontrollproben notwendig. Im Vergleich zeigten die gefriergetrockneten Proben eines Fruchtwasserpools geringe Vorteile gegenüber den tiefgefrorenen Proben desselben Fruchtwassers. Beide erschienen aber durch nicht quantifizierbare Variationen nicht zuverlässig genug, um als Qualitätskontrollproben zu dienen.

Mit der hier beschriebenen Standardarbeitstechnik ist die Bestimmung der L/S-Ratio mit einem Variationskoeffizienten in der Serie von 5,4 % möglich.

Die Probleme der Qualitätskontrolle der Bestimmung und der Präzision von Tag zu Tag sind noch ungelöst.

Literaturverzeichnis:

1 Abramovich, D.R., Keeping, J.D., Thom, H.
The Origin of Amniotic-Fluid-Lecithin.
Brit. J. Obstet. Gynaecol., 1975, 82: 204-207

2 Abrams, M.E.
Isolation and Quantitative Estimation of Pulmonary Surface-Active Lipoprotein
J. Appl. Physiol. 1966, 21: 718-20

3 Adams, F.H., Enhorning, G.
zitiert nach Goerke
Acta Physiol. Scand. 68, 23-27, 1966

4 Althaus, H.H., Neuhoff, V.
One-Dimensional Micro-Chromatography of Phospholipids and Neutral Lipids on Sodium Silicate-Impregnated Silica Gel Layers
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1973, 354: 1073-76

5 Arias, F., Andrinopoulos, G., Pimda, J.
Correlation between Amniotic Fluid Optical Density, L/S-Ratio, and Fetal Pulmonary Maturity
Obstetrics and Gynecology 1978, 51,2: 152-56

6 Badham, L.P., Worth, H.G.J.
Critical Assessment of Phospholipid Measurement in Amniotic Fluid
Clin. Chem. 1975, 21,10: 1441-47

7 Ballard, P.L., Grauberg, P., Ballard, R.A.
Glucocorticoid Levels in Maternal and Cord Serum after Prenatal Betamethasone Therapy to Prevent Respiratory Distress Syndrome
J.Clin.Invest. 56, 1518 1975

8 Bhagwanani, S.G., Fahmy, D., Turnbull, A.C.
Quick Determination of Amniotic Fluid Lecithin Concentration for Prediction of Neonatal Respiratory Distress
Lancet 1972, 2: 66-67

9 Blass, K.G., Thibert, R.J., Draisey, T.F.
Simple, Rapid Determination of Lecithin and Sphingomyelin in Amniotic Fluid
Clin. Chem. 1973 19,12: 1394-96

10 Blau, K.
Colour Stabilization of Stained Phospholipids Spots in the Determination of the Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio
Clin. Chim. Acta 1975 64: 217-18

11 Borer, R.C., Gluck, L., Freeman, R.K., Kulovich, M.V.
Prenatal Prediction of the Respiratory Distress Syndrome (RDS)
Pediat. Res. 5 , 655 (1971)

12 Boughton, K., Gandy, G., Gairdner, D.
Hyaline Membrane Disease II: Lung Lecithin
Arch. Dis. Child. 45: 311-320, 1970

13 Bryson, M.J., Gabert, H.A., Stenchever, M.A.
Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio as an
Assessment of Fetal Pulmonary Maturity
Am. J. Obstet. Gynecol. 114,2 208-13, 1972

14 Buhi, W.C., Spellacy, W.N.
Effects of Blood and Meconium on the Determination of
Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio
Am. J. Obstet. Gynecol. 121,3: 321-24, 1975

15 Carson,H.S., Taeusch, H.W., Avery, M.E.
Inhibition of Lung Cell Division after Hydrocortisone
Injection into Fetal Rabbits
J. Appl. Physiol. 34, 660 1973

16 Caspi, E., Schreyer, P., Tamir, I.
The Amniotic Fluid Foam Test, L/S Ratio and Total
Phospholipids in the Evaluation of Fetal Lung Maturity
Am. J. Obstet. Gynecol. 122,3: 323-26, 1975

17 Caspi, E., Schreyer, P., Weinraub, Z., Bukovsky, I.,
Tamir, I.
Amniotic Fluid Volume, Total Phospholipids Concentration,
and L/S Ratio in Term Pregnancies
Am. J. Obstet. Gynecol. 122,3: 327-31, 1975

18 Caspi, E., Schreyer, I., Schreyer, P., Weinraub, Z.,
Tamir, I.
Changes in Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio
following Maternal Dexamethasone Administration
Obstet. Gynecol. 46,5: 584-87, 1975

19 de Castro, F., Usategui-Gomez, M., Spellacy, W.M.,
Amniotic Fluid Components as Determinants of Fetal
Maturity
Obstet. Gynecol. 46,1: 77-79, 1975

20 Cherayil, G.D., Wilkinson, E.J., Borwowf, H.I.
Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio Changes
Related to Centrifugal Force
Obstet. Gynecol. 50,6: 682-89, 1977

21 Chevalier, G., Collet, A.J.
In Vivo Incorporation of Cholin-^{3}H, Lencin-^{3}H and
Galactose-^{3}H in Alveolar Type II Pneumocytes in Relation
to Surfactant Synthesis. A Quantitative Radioautographic
Study in Mouse by Electron Microscopy.
Anat. Rec. 174: 289-310, 1972

22 Chu, J., Clements, J.A., Cotton, E.K., Klaus, M.H.,
Sweet, A.Y., Tooley, W.H.
zitiert nach Goerke
Paediatrics 40, 709-82, 1967

23 Clements, J.A., Platzker, A.C.G., Tierney, D.F.
Assessment of the Risk of the Respiratory Distress Syndrome by a Rapid Test for Surfactant in Amniotic Fluid
The New England J. of Medicine 286, 20: 1077-81, 1972

24 Clements, J.A., Hustead, R.F., Johnson, R.P., Gribetz, I.
Pulmonary Surface Tension and Alveolar Stability
J. Appl. Physiol. 16: 444-50, 1961

25 Clements, J.A.
The Alveolar Lining Layer in: Development of the Lung
Ciba Found. Symp. Boston: Little Brown & Cie. 1967

26 Coch, E.H., Kessler, G., Meyer, J.S.
Rapid Thin-Layer Chromatographic Method for Assessing the Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid
Clin. Chem. 20,10: 1368-75, 1974

27 Copeland, W., Stempel, L., Lott, J.A., Zuspan, F.P.
Assessment of a Rapid Test on Amniotic Fluid for Estimating Fetal Lung Maturity
Am. J. Obstet. Gynecol. 130,2: 225-28, 1978

28 Cruz, A.C., Buhi, W.C., Spellacy, W.N.
Comparison of The Fetogram and L/S Ratio for Fetal Maturity
Obstet. Gynecol. 46,1: 77-79, 1975

29 Cruz, A.C., Buhi, W.C., Birk, S.A., Spellacy, W.N.
Respiratory Distress Syndrome with Mature Lecithin/Sphingomyelin Ratios: Diabetes mellitus and Low Apgar Scores
Am J. Obstet. Gynecol. 126,1: 78-82, 1976

30 Cunningham, M.D., Desai, N.S., Thompson, S.A., Greene, J.M.
Amniotic Fluid Phosphatidylglycerol in Diabetic Pregnancies
Am.J.Obstet. Gynecol. 131, 7 719-24, 1978

31 Dahlenberg, G.W., Martin, F.I.R., Jeffrey, P.E., Horacek, I.
Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Pregnancy, Complicated by Diabetes
Brit. J. Obstet. Gynaecol. 84,4: 294-300, 1977

32 Darrah, H.K., Hedley-Whyte, J.
Rapid Incorporation of Palmitate into Lung: Site and Metabolic Fate
J. Appl. Physiol. 34, 205, 1973

33 Dermer, G.B.
Amniotic Fluid Tests for Fetal Maturity in Normal and Abnormal Pregnancies
J. Ultrastruct.Res. 33, 306-17, 1970

34 De Souza, S.W., Adlard, B.P.F.
Growth of Suckling Rats after Treatment with Dexamethasone or Cortisol. Implications of Steroid Therapy in Human Infants.
Arch.Dis. Childh. 48, 519, 1973

35 Doran, T.A., Malone, R.M., Benzie, R.J., Jones Owen, V., Thompson, D.W.
Amniotic Fluid Tests for Fetal Maturity in Normal and Abnormal Pregnancies
Am. J. Obstet. Gynecol. 125,5: 586-93, 1976

36 Duhring, J.L., Thompson, S.A.
Amniotic Fluid Phospholipid Analysis in Normal and Abnormal Pregnancies
Am. J. Obstet. Gynecol. 121,1: 218-220, 1975

37 Dyson, D., Blake, M., Cassady, G.
Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Complicated Pregnancies
Am. J. Obstet. Gynecol. 122,6: 772-81, 1975

38 Editorial Comment
Lancet 1, 74, 1976

39 Egge, H., Murawski, U., Müller, J., Zilliken, F.
Mikrolipidanalysen aus Serum mit dem Eppendorfsystem 3000
Z. Klin. Chem. u. Klin. Biochem. 8: 488-91, 1970

40 Enhorning, G., Robertson, B., Milne, E., Wagner, R.
Radiologic Evaluation of the Premature Newborn Rabbit after Pharyngeal Deposition of Surfactant
Am. J. Obstet. Gynecol. 121,4: 475-480, 1975

41 Epstein, M.F., Farrell, P.M.
The Choline Incorporation Pathway: Primary Mechanism for "de novo" Lecithin Synthesis in Fetal Primate Lung
Pediat. Res. 9: 658-65, 1975

42 Epstein, M.F., Farrell, P.M., Chez. R.A.
Fetal Lung Metabolism and the Amniotic Fluid L/S Ratio in Rhesus Monkey Gestations
Am.J.Obstet. Gynecol. 125,4: 545-49, 1976

43 Falconer, G.F., Hodge, J.S., Gadd, R.L.
Influence of Amniotic Fluid Volume on Lecithin Estimation in Prediction of Respiratory Distress
Brit. Med. J. 2: 689-91, 1973

44 Farrell, P.M., Zackman, R.D.
Science 179: 297-98, 1973

45 Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H.
A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues
J. Biol. Chem. 226: 497-509, 1957

46 Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J.A., Le Baron, F.N.
Preparation of Lipid Extracts from Brain Tissue
J. Biol. Chem. 191, 833, 1951

47 Frosolono, M.F., Roux, J.F.
Surface-active Material in Human Amniotic Fluid
Am. J. Obstet. Gynecol. 130, 5, 562-566, 1978

48 Gandy, G., Jacobson, W., Gairdner, D.
Arch. Dis. Childh.45: 289, 1970

49 Gebhardt, D.O.E., Beintema, A., de Rooij, R.E., Wildeboer, F.N.
A Study of the Lecithin/Sphingomyelin Ratio of Amniotic Fluid
Clin. Chim. Acta 64: 132-42, 1975

50 Gebhardt, D.O.E., Beintema, A.
A Comparison between the Lecithin/Sphingomyelin Ratio of Gluck and Other Phospholipid Values of Amniotic Fluid
Am. J. Obstet. Gynecol. 122,6: 734-36, 1975

51 Gerner, R., Halterstadt, E., Schwarz, H., Stein, W.W.
Action of Sympythomimetics on Phospholipid-Synthesis in Fetal Lung
Arch Gynecol. 224: 215, 1977

52 Gil, J., Weibel, E.R.
Improvements in Demonstration of Lining Layer of Lung Alveoli by Electron Microscopy
Respir. Physiol. 8: 13-36, 1970

53 Gil, J., Reiss, O.K.
J. Cell. Biol. 68, 152-71, 1973

54 Gilbert, J.M., Taylor, N.F.
A Comparison between the Lecithin/Sphingomyelin Ratio and the Nile Blue Sulphate Test in the Estimation of Fetal Maturity.
Acta Obstet. Gynaecol. Scand. 56, 5: 491-495, 1977

55 Giridhar, V., Dalal, F.R., Winsten, S.
Molybdenum Blue Reagent Used in Determination of the Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid
Clin. Chem. 20,4: 513-514, 1974

56 Glass, L., Rajegowda, B.K., Evans, H.E.
Absence of Respiratory Distress Syndrome in Premature Infants of Heroin-Addicted Mothers
Lancet 2: 685-686, 1971

57 Gluck, L., Motoyama, E.K., Smits, H.L., Kulovich, M.V.
The Biochemical Development of Surface Activity in Mammalian Lung I. The Surface-Active Phospholipids; the Separation and Distribution of Surface-Active Lecithin in the Lung of the Developing Rabbit Fetus
Pediat. Res. 1: 237-246, 1967

58 Gluck, L., Kulovich, M.V., Borer, R.C., Brenner, P.H., Spellacy, W.N.
Diagnosis of the Respiratory Distress Syndrome by Amniocentesis
Amer. J. Obstet. Gynecol. 109,3: 440-445, 1971

59 Gluck, L., Kulovich, M.V., Eidelman, A.I., Cordero, L., Khazin, A.F.
Biochemical Development of Surface Activity in Mammalian Lung. IV. Pulmonary Lecithin-Synthesis in the Human Fetus and Newborn and Etiology of the Respiratory Distress Syndrome
Pediat. Res. 6: 81-99, 1972

60 Gluck, L., Kulovich, M.V.
Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid in Normal and Abnormal Pregnancies
Amer.J. Obstet. Gynecol. 115,4: 539-546, 1973

61 Gluck, L., Kulovich, M.V., Borer, R.C., Keidel, W.N.
The Interpretation and Significance of the Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid
Amer.J. Obstet. Gynecol. 120,1: 142-155, 1974

62 Goerke, J.
Lung Surfactant
Biochim. Biophys. Acta 344: 241-261, 1974

63 Goldkrand, J.W., Varki, A., Mellurg, J.E.
Surface-Tension of Amniotic Fluid Lipid Extracts - Prediction of Pulmonary Maturity
Amer.J. Obstet. Gynecol. 128,6: 591-599, 1977

64 Goldstein, P., Hobbins, J.C.
Fetal biparietal Diameter as a Predictor of a Mature Lecithin/Sphingomyelin Ratio
Obstet. Gynecol. 48,6: 667, 1976

65 Grosspietzsch,W.J, Klitzing, L.V.
Organ Distribution of Intraamniotic C-14-Labelled Lecithin in Pregnant Dwarf Swine
Arch. Gynecol. 224: 214, 1977

66 Gusdon, J.P., Waite, B.M.
Colorimetric Method for Amniotic Fluid Phospholipds and Their Relationship to the Respiratory Distress Syndrome
Amer.J. Obstet. Gynecol. 112: 62-71, 1972

67 Hallman, M., Feldman, B., Gluck, L.
RDS: The Absence of Phosphatidylglycerol in Surfactant
Pediat. Res. 9: 396 Nr. 837, 1975

68 Hallman, M.
Feder. Proc. 315: 274, 1975

69 Hallman, M., Gluck, L.
Phosphatidylglycerol in Lung Surfactant: II. Subcellular Distribution and Mechanism of Biosynthesis in Vitro
Biochim. Biophys. Acta 409: 172-191, 1975

70 Hallman, M., Kulovich, M.V., Kirkpatrick, E., Sugarman, R.G., Gluck, L.
Phosphatidylinositol and Phosphatidylglycerol in Amniotic Fluid: Indices of Lung Maturity
Amer.J. Obstet. Gynecol. 125,5: 613-617, 1976

71 Hallman, M., Gluck, L.
Phosphytidylglycerol in Lung Surfactant: III. Possible Modifier of Surfactant Function
J. Lipid Res. 17: 257-262, 1976

72 Harding, P., Possmayer, F., Milne, K., Jaco, N.T., Walters, J.H,
Amniotic Fluid Phospholipids and Fetal Maturity
Amer.J. Obstet. Gynecol. 115,3: 298-306, 1973

73 Henderson, R.F., Pfleger, R.C.
Surface Tension Studies of Phosphatidyl Glycerol Isolated from the Lungs of Beagle Dogs
Lipids, 7: 492-494, 1972

74 Herbst, J., Wickings, E.J., Quakernack, K., Dame, W.R., Nieschlag, E.
Cortisol im Fruchtwasser und im mütterlichen Blut - Ein Parameter zur Bestimmung der fetalen Lungenreife?
Z. Geburtsh. u. Perinat. 182, 212-218, 1978

75 Hezel, U.
Quantitative Photometrie an Dünnschicht-Chromatogrammen für Routine und Forschung
G-I-T Fachz. Lab. 21, 1977, 694-704

76 Hills, B.A.
zitiert nach Goerke (55)
Resp. Physiol. 13: 50-61, 1971

77 Hudson, E.A., Gauntlett, J.
Amniotic Fluid Cells and Lecithin/Sphingomyelin Ratio
Obstet. Gynecol. 49,3, 1977

78 Ip, M.P.C., Draisey, T.F., Thibert, R.J., Gagneja, G.L., Jasey, G.M.
Fetal Lung Maturity as Assessed by GLC Determination of Phospholipid-Palmizoyl Acid in Amniotic Fluid
Clin. Chem. 23,1: 35-40, 1977

79 Jackson, R.W., Anderson, G.D., Held, B.
Amniotic Fluid Phospholipids and Fetal Lung Maturity: I. Assessment of Various Methods of Determining Lecithin and Sphingomyelin
Amer. J. Obstet. Gynecol. 121,8: 1095-1099, 1975

80 Jimenez, J.M., Schultz, F.M., Johnston, J.M.
Fetal Lung Maturation: III. Amniotic Fluid Phosphatidic Acid Phosphohydrolase (PAPase) and Its Relation to Lecithin/Sphingomyelin Ratio
Obstet. Gynecol. 46,5: 588-590, 1975

81 Johnson, L.W.
Determining Fetal Lung Maturity - Sensitive Surfactant Method
Amer.J. Obstet. Gynecol. 129,2: 190-197, 1977

82 Johnson, B., Hensleigh, P.A.
Surfactant Test and Amniotic Fluid Cortisol
Amer. J. Obstet. Gynecol. 129,1: 1977

83 Keniston, R.C., Pernoll, M.L., Buist, R.M., Lyon, M., Swanson, J.R.
A Prospective Evaluation of the Lecithin/Sphingomyelin Ratio and the Rapid Surfactant Test in Relation to Fetal Pulmonary Maturity
Amer.J. Obstet. Gynecol. 121,3: 324-332, 1975

84 Keniston, R.C., Prescott, G.H., Pernoll, M.L.
Effects of Freezing and Thawing on Certain Properties of Early Gestation Amniotic Fluid
Obstet. Gynecol. 46,3: 279-281, 1975

85 Kikkawa, Y., Hahn, H., Yang, S., Bernstein, J.
Mucopolysoccharide in the Pulmonary Alveolus II. Electron Microscopic Observations
Lab. Invest. 22: 272-280, 1970

86 Kikkawa, Y., Motoyama, E.K., Cook, C.D.
The Ultrastructure of the Lungs of Lambs: The Relation of Osmiophilic Inclusions and Alveolar Lining Layer to Fetal Maturation and Experimentally Produced Respiratory Distress
Amer. Pathol. 47: 877, 1965

87 King, R.J.
The Surfactant System of the Lung
Feder. Proceed. 33, 11: 2238-2247, 1974

88 Kiyasu, J.Y., Mathur, R.
Considerations in Determining Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid
Clin. Chem. 19,12: 1224-1225, 1973

89 Klaus, M.H., Reiss, O.K., Tooley, W.H., Piel, C., Clements, J.A.
zitiert nach Goerke
Science 137, 750-51, 1962

90 Kling, O.R., Kotas, R.V.
Endocrine Influence on Pulmonary Maturation and the Lecithin/Sphingomyelin Ratio in the Fetal Baboon
Amer.J. Obstet. Gynecol. 122,6: 664-669, 1975

91 Kohl, H.H., Telander, D.H., Roberts, E.C., Elliot, H.C.
Modified Method for Estimating Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid
Clin. Chem. 24,1: 174-176, 1978

92 Kotas, R.V.
The Estimation of Perinatal Pulmonary Maturity: A Commentary
J. Paediatrics 81,2: 378-383, 1972

93 Kuhn, C.
Cytochemistry of Pulmonary Alveolar Epithelial Cells
Amer.J. Pathol. 53: 809, 1968

94 Kuss, E.
Biochemie und präpartale Diagnostik der Lungenreifung
J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 14: 505-513, 1976

95 Kynast, G., Saling, E.Z.
Rapid Specific Determination of Amniotic Fluid Lecithins as a Test of Fetal Lung Maturity
J. Perinat. Med. 1: 213-218, 1973

96 Kynast, G., Saling, E.Z.
Routine Diagnosis of Fetal Lung Maturity
J. Perinat. Med. 2: 208-213, 1974

97 Lefebvre, Y., Marier, R., Amyot, G., Bilodeau, R., Raynault, P.
Maternal, Fetal, and intra-amniotic Hormonal and Biologic Changes Resulting from a Single Dose of Hydrocortisone Injected in the intra-amniotic Compartment
Amer.J. Obstet. Gynecol. 125,5: 609-612, 1976

98 Liedtke, B., Bartsch, G., Schulte, H.J., Klöck, F.K.
Vergleichende Lipiduntersuchungen in den Seren von mütterlichem Blut, von Nabelarterien- sowie Nabelvenenblut zur Frage des Zusammenhanges zwischen mütterlichem und fetalem Lipidstoffwechsel
Z. Geburtsh. Perinat. 180: 342-348, 1976

99 Liedtke, B., Bartsch, G., Löhr, J.P.
Gesamtlipide, Lipidfraktionen und Fettsäuren der Phospholipide in Plazenten reifer, prämaturer und dystropher Neugeborener
Z. Geburtsh. Perinat. 180: 349-355, 1976

100 Liedtke, B., Bartsch, G.
Vergleichende Untersuchungen der Lipide mit Darstellung des Fettsäuremusters der Gesamtphosphatide und des Lecithins im Lungengewebe postpartal an einem Atemnotsyndrom verstorbener Neugeborener
Z. Geburtsh. Perinat. 180: 334-341, 1976

101 Liggins, G.C., Howie, R.N.
A Controlled Trial of Antepartum Glucocorticoid Treatment for Prevention of the Respiratory Distress Syndrome in Premature Infants
Paediatrics 50: 515-525, 1972

102 Lobstein
Reagent for Measurement of Lecithin/Sphingomyelin-Ratio
Letter
Clin. Chem. 20,7: 917, 1974

103 Löfstrand, T., Fex, G.
The Value of Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio Determination in Prediction of Hyalin Membrane Disease
Acta Obstet. Gynecol. Scand. 55,5: 413-419, 1976

104 Löfstand, T., Fex, G.
Changes in Amniotic Fluid Phospholipids on Treatment with Glucocorticoids to Prevent Respiratory Distress Syndrome
Acta Obstet. Gynecol. Scand. 55,5: 419-429, 1976

105 Lorenz, U. et al.
Fetal Pulmonary Surfactant Induction by Bromhexine Metabolite VIII
Amer.J. Obstet. Gynecol. 119, 1126, 1974

106 Macklin, C.C.
The Pulmonary Alveolar Mucoid Film and the Pneumocytes
Lancet, 1: 1099, 1954

107 Mallikarjuneswara, V.R
Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid Using Precoated TLC Sheets
Clin. Chem. 21,2: 260-263, 1975

108 Massaro, G.D., Massaro, D.
Granular Pneumocytes: Electron Microscopic Radioautographic Evidence of Intracellular Protein Transport
Amer. Rev. Resp. Dis. 105: 927-31, 1972

109 Masson, D., Diedrich, K., Stephan, R., Rehm, G.
Comparison of Biochemical and Physical Methods for Determination of Fetal Lung Maturity (Vergleich biochemischer und physikalischer Methoden zur Bestimmung der fetalen Lungenreife)
Arch. Gynäcol. 224: 205-207, 1977

110 McCann, D.S., Kirkish, L.S., Barclay, M.L., Blair, A.J.
Laboratory Assessment of Fetal Lung Maturity - Lecithin/Sphingomyelin-Ratio Versus Cortisol and Foam-Test-Assays
Clin. Chem. 23, 12:2250-2254, 1977

111 MacLennan, A.H., Roxburgh, D., Thornton, C., Knightley, M.
Palmitic Acid Levels in Amniotic Fluid and the Shake Test
Brit. J. Obstet. Gynaecol. 82: 199-203, 1975

112 Mead, J., Whittenberger, J.L., Radford, E.P.
zitiert nach Goerke (55)
J. Appl. Physiol. 10: 191-196, 1957

113 Moore, R.A., O'Neil, K.T.J., Cooke, R.J.
Palmitic Acid and Lecithin Measurements in Amniotic Fluid
Brit. J. Obstet. Gynaecol. 82: 194-198, 1975

114 Morrison, R.L., Ruh, T.S.
A Method for Determination of Lecithin and Sphingomyelin in Amniotic Fluid
Amer.J. Obstet. Gynecol. 118,4: 493-495, 1974

115 Morrison, J.C., Wiser, W.L., Arnold, S.W., Whybrew, W.D., Morrison, D.L.
Modification of the Lecithin/Sphingomyelin Assay for Fetal Development
Amer.J. Obstet. Gynecol. 120,8: 1087-1091, 1974

116 Morrison, J.C., Whybrew, W.D., Bucovaz, E.T., Wiser, W.L., Fish, S.A.
Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Cases Associated with Fetomaternal Disease
Amer. J. Obstet. Gynecol. 127,4: 363, 1977

117 Morrison, J.C., Whybrew, W.D., Bucovaz, E.T., Wiser, W.L., Fish, S.A.
Amniotic Fluid Tests for Fetal Maturity in Normal and Abnormal Pregnancies
Obstet. Gynecol. 49,1: 1977

118 Muellerheubach, E., Caritis, S.N., Edelstone, D.I., Turner, J.H.
Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid and Its Value for Prediction of Neonatal Respiratory Distress Syndrome in Pregnant Diabetic Women
Amer. J. Obstet. Gynecol. 130,1: 28-35, 1978

119 Munden, J.W., Swarbrick, J.
zitiert nach Goerke (55)
J. Colloid. Interface Sci. 42, 657-659, 1973

120 Myers, J.L., Harrell, M.J.P., Hill, F.L.
Fetal Maturity: Biochemical Analysis of Amniotic Fluid
Amer. J. Obstet. Gynecol. 121,7: 961-967, 1975

121 Nakamura, J., Roux, J.F., Brown, E.G., Sweet, A.Y.
Total Lipids and the Lecithin/Sphingomyelin Ratio of Amniotic Fluid: An Antenatal Test of Lung Immaturity?
Amer. J. Obstet. Gynecol. 113,3: 363-366, 1972

122 Nelson, G.H.
Amniotic Fluid Phospholipid Patterns in Normal and Abnormal Pregnancies
Amer. J. Obstet. Gynecol. 105,7: 1072-1077, 1969

123 Nelson, G.H., Freedman, D.S.
Relationship Between Amniotic Fluid Triglyceride Levels and Fetal Maturity
Amer. J. Obstet. Gynecol. 111,7: 930-933, 1971

124 Nelson, G.H.
zitiert nach Goerke (55)
Amer. J. Obstet. Gynecol. 115: 933, 1973

125 Nelson, G.H.
Relationship between Amniotic Fluid Lecithin Concentration and Respiratory Distress Syndrome
Amer. J. Obstet. Gynecol. 112: 827-833, 1972

126 Nelson, G.H.
Risk of Respiratory Distress Syndrome as Determined by Amniotic Fluid Lecithin Concentration
Amer. J. Obstet. Gynecol. 121,6: 753-755, 1975

127 Nelson, G.H., Eguchi, K., McPherson, J.C.
Effects of Gestational Age, Dexamethasone, and Metopirone on Lecithin-Concentration in Fetal Lung Tissue and Amniotic Fluid in Rats and Guinea Pigs
Gynecol. Invest. 7,6, 1976

128 Nelson, G.H.
Respiratory Distress Syndrome with Mature Lecithin/Sphingomyelin Ratio - Diabetes Mellitus and Low Apgar Scores
Amer. J. Obstet. Gynecol. 129,2: 231, 1977

129 Neuhoff, V., Schiefer, H.G.
Fluorometric Microdetermination of Phospholipids on the Cellular Level
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352: 913-926, 1971

130 Obladen, M.
Atemnot-Syndrom: Welcher Säugling überlebt?
Selecta, 3: 190, 1977

131 Ohrlander, S.A.V., Gennser, G.M., Grennert, L.
Impact of Betamethasone Load Given to Pregnant Women on Endocrine Balance of Fetoplacental Unit
Amer. J. Obstet. Gynecol. 123,3: 228-36, 1975

132 Olson, E.B., Graven, S.N.
Comparison of Visualization Methods Used to Measure the Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid
Clin. Chem. 20,11: 1408-15, 1974

133 Olson, E.B., Hartline, J.V., Schneider, J.M., Graven, S.N.
The Use of Amniotic Fluid Bubble Stability, L/S Ratio, and Creatinine Concentration in the Assessment of Fetal Maturity
Amer. J. Obstet. Gynecol. 122,6: 755-760, 1975

134 Olson, E.B., Graven, S.N., Zachman, R.D.
Amniotic Fluid Lecithin to Sphingomyelin Ratio of 3.5 and Fetal Pulmonary Maturity
Pediat. Res. 9: 65-69, 1975

135 Owen, V.M.J.
Verification of Visual Quantitation of Amniotic Fluid Lecithin and Sphingomyelin on Thin-Layer Chromatography
Amer. J. Obstet. Gynecol. 116,6: 888-89, 1973

136 Parkinson, C.E., Harvey, D.R.
A Comparison between the Lecithin/Sphingomyelin Ratio and Other Methods of Assessing the Presence of Fetal Pulmonary Surfactant in Amniotic Fluid
J. Obstet. Gynaecol. Brit. Com. 80: 406-11, 1973

137 Pattle, R.E.
Properties, Function and Origin of the Alveolar Lining Layer
Nature 175: 1125-26, 1955

138 Pattle, R.E.
Specificity and Reproducibility of Acetone Precipitation in Identifying Surface-Active Lecithin in Amniotic Fluid
Physiol. Rev. 45: 48-79, 1965

139 Penney, J.
Surface Lining of Lung Alveoli
Clin. Chem. 22,5: 681-82, 1976

140 Pfleger, R.C., Henderson, R.F., Waide, J.
Phosphatidyl Glycerol - A Major Component of Pulmonary Surfactant
Chem. Phys. Lipids 9: 51-68, 1972

141 Plotz, E.J., Schander, K., Kubli, F.
Der vorzeitige Blasensprung - Ein schriftliches Symposion
Geburtsh. u. Frauenheilk. 37, 997-1023, 1977

142 Pownall, H.J., Morrisett, J.D., Gotto, A.M.
Apolipoproteins to Phospholipid Bilayer Mixtures
J. Lipid. Res. 18,1: 14-24, 1977

143 Quinlivan, W.L.G., Reynolds, W.F., Maratte, T. et al.
An Evaluation of Multiple Tests and the Lecithin/Sphingomyelin Ratio For Determination of Gestational Age
Amer. J. Obstet. Gynecol. 116: 1147-51, 1973

144 Radford, E.P.Jr.
zitiert nach Goerke (55)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 87: 58-61, 1954

145 Ramzin, M.S.
Fruchtwasseruntersuchungen am Ende der Schwangerschaft: III. Phospholipide in der Spätschwangerschaft
Gynäkologe 6: 206-13, 1973

146 Redding, R.A., Douglas, W.H., Stein, M.
Thyroid Hormone Influence upon Lung Surfactant Metabolism
Science, 175: 994-96, 1972

147 Rethmeier, H.B., Egberts, H.
Transversal and Longitudinal Lecithin-Sphingomyelin Ration in Amniotic and Lung Fluids of Fetal Lambs
Amer. J. Obstet. Gynecol. 122,5: 593-596, 1975

148 Rooney, M.A., Canavan, P.M., Motoyama, E.K.
Identification of Phosphatidylglycerol in the Rat, Rabbit, Monkey, and Human Lung
Biochim. Biophys. Acta 360: 56-67, 1974

149 Rosenthal, A.F., Vargas, M.G., Schiff, S.V.
Comparison of Four Indexes to Fetal Pulmonary Maturity
Clin. Chem. 20,4: 486-491, 1974

150 Roth, J.
Electron Microscopic Demonstration of Saccharide Moieties in the Hypophase of the Alveolar Surfactant System
Respir. Physiol. 23: 325-335, 1975

151 Roux, J.F., Nakamura, J., Brown, E., Sweet, A.Y.
The Lecithin-Sphingomyelin Ratio of Amniotic Fluid: An Index of Fetal Lung Maturity?
Pediat. Res. 49, 464-467, 1972

152 Roux, J.F., Nakamura, J., Frosolono, M.
Fatty Acid Composition and Concentration of Lecithine in the Acetone Fraction of Amniotic Fluid Phospholipids
Amer. J. Obstet. Gynecol. 119,6: 838-843, 1974

153 Sarkozi, L., Kovacs, H.N., Fox, H.H. et al.
Modified Method for Estimating the Phosphatidylcholine/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid and Its Use in the Assessment of Lung Maturity
Clin. Chem. 18: 956-960, 1972

154 Saule, H.
Antiatelektasefaktor (Surfactant) und Hyaline-Membranen-Krankheit bei Frühgeborenen
Med. Klin. 70: 409-415, 1975

155 Scarpelli, E.M.
Pulmonary Surfactant and Their Role in Lung Disease
Adv. Pediat. 16: 177-210, 1969

156 Scarpelli, E.M., Condrorelli, S., Colacicco, G., Cosmi, E.V.
Lamb Fetal Pulmonary Fluid:II Fate of Phosphatidylcholine
Pediat. Res. 9, 195-201, 1975

157 Schirar, A., Vielh, J.P., Alcindor, L.G., Gautray, J.P.
Amniotic Fluid Phospholipids and Fatty Acids in Normal Pregnancies
Amer. J. Obstet. Gynecol. 121,5: 653-663, 1975

158 Schulman, J.D. et al.
Lecithin-Sphingomyelin Ratios in Amniotic Fluid - Relation to Neonatal Condition and Gestational Age
Obstet. Gynecol. 40: 697, 1972

159 Sgoutas, D., Jones, R.
Quantitation of the Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid by a Simple Charring Method
Amer. J. Obstet. Gynecol. 119,7: 929-932, 1974

160 Shelley, S.A., Takagi, L.R., Balis, J.U.
Assessment for Surfactant Activity in Amniotic Fluid for Evaluation of Fetal Lung Maturity
Amer. J. Obstet. Gynecol. 116: 369-376, 1973

161 Shinitzky, M., Goldfisher, A., Bruck, A., Goldman, B., Stern, E. et al.
A New Method For Assessment of Fetal Lung Maturity
Brit. J. Obstet. Gynaecol. 83, 11, 1976

162 Singh, E.J., Zuspan, F.P.
A Method For Determination of Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid
Arch. Gynäk. 218: 169-171, 1975

163 Singh, E.J., Mejia, A., Zuspan, F.P.
Studies of Human Amniotic Fluid Phospholipids in Normal, Diabetic, and Drug-abuse Pregnancy
Amer. J. Obstet. Gynecol. 119,5: 623-629, 1974

164 Sivakumaran, T., Duncan, M.L., Effer, S.B., Younglai, E.V.
Relationship between Cortisol and Lecithin/Sphingomyelin Ratios in Human Amniotic Fluid
Amer. J. Obstet. Gynecol. 122,3: 291-294, 1975

165 Smith, B.T., Torday, J.S., Giroud, C.J.P.
Evidence for Different-Gestation-Dependent Effects of Cortisol on Cultured Fetal Lung Cells
Clin. Invest. 53: 1518-1525, 1974

166 Spellacy, W.N., Buhi, W.C.
Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio as an Index of Fetal Maturity
Obstet. Gynecol. 39,6: 852-860, 1972

167 Spellacy, W.N., Gelman, S.R., Wood, S.D., Birk, S.A., Buhi, W.C.
Comparison of Fetal Maturity Evaluation with Ultrasonic Biparietal Diameter and Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio
Obstet. Gynecol. 51,1: 109-111, 1978

168 Spellacy, W.N., Cruz, A.C., Buhi, W.C., Birk, S.A.
Amniotic Fluid Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Twin Gestation
Obstet. Gynecol. 50, 1: 68-71, 1977

169 Stephan, M., Diedrich, K., Masson, D., Rehm, G., Krebs, D.
Lecithin/Sphingomyelin Ratio and Its Relation of Severity of Respiratory Distress Syndrome (Die L/S Ratio und ihre Beziehung zum Schweregrad des Atemnotsyndroms)
Arch. Gynäkol. 224: 206, 1977

170 Thannhauser, S.J., Benotti, J., Boncoddo, N.F.
zitiert nach Goerke
J. Biol. Chem. 166, 669-675, 1946

171 Thom, H., Dinwiddie, R., Fisher, P.M., Russell, G., Sutherland, H.W.
Palmitic Acid Concentrations and Lecithin/Sphingomyelin Ratios in Amniotic Fluid
Clin. Chim. Acta 62: 143-147, 1975

172 Thom, M.L., Zachman, R.D.
The Enzymes of Lecithin Biosynthesis in Human Neonatal Lungs: IV Phosphorylcholine Cytidyltransferase
Pediat. Res. 9, 201-205, 1975

173 Torday, J.S., Smith, B.T., Giroud, C.J.P.
The Rabbit Fetal Lung as a Glucocorticoid Target Tissue
Endocrinology 96: 1462-1467, 1975

174 Verder, H., Clausen, J.
Assay of Phospholipids in the Amniotic Fluid
Clin. Chim. Acta 51:257-269, 1974

175 Verhoeven, A.G.J., Merkus, H.M.W.M.
Procedure for the Determination of the Lecithin-Sphingomyelin (L/S) Ratio in Amniotic Fluid, with a New Detection Reagent
Clin. Chim. Acta 53: 229-232, 1974

176 Vestermark, S.E.
zitiert nach Goerke (55)
Upsala Läkareförens. Förh. N.F. 38, 1-4, 1932

177 Vilallonga, F.
zitiert nach Goerke (55)
Biochim. Biophys. Acta 163: 290-300, 1968

178 von Neergard, K.
zitiert nach Goerke
Z. Gesamte Exp. Med. 66, 373-394, 1929

179 Vujic, J., Djuric, N., Vranes, N., Ciglar, S., Tadej, D. et al.
Phospholipids in Amniotic Fluid and Pharmaceutical Prophylaxis of Respiratory Distress Syndrome (Phospholipide im Fruchtwasser und medikamentöse Prophylaxe des Respiratory-Distress-Syndrom)
Arch. Gynäkol. 224: 208-213, 1977

180 Wagstaff, T.I., Bromham, D.R.
A Comparison between the Lecithin/Sphingomyelin Ratio and the "Shake Test" for the Estimation of Surfactant in Amniotic Fluid
J. Obstet. Gynaecol. Brit. Com. 80: 412-417, 1973

181 Wagstaff, T.I., Whyley, G.A., Freedman, G.
Factors Influencing the Measurement of the Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid
J. Obstet. Gynaecol. Brit. Com. 81: 264-277, 1974

182 Watkins, J.C.
The Surface Properties of Pure Phospholipids in Relation to those of Lung Extracts
Biochim. Biophys. Acta 152: 293-306, 1968

183 Whitt, G.G., Buster, J.E., Killam, A.P., Scragg, W.H.
A Comparison of two Glucocorticoid Regimens for Acceleration of Fetal Lung Maturation in Premature Labor
Amer. J. Obstet. Gynecol. 124,5: 479-482, 1976

184 Whittle, M.J., Hill, C.M., Harkes, A.
The Effect of Labour on the Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Serial Samples of Amniotic Fluid
Brit. J. Obstet. Gynaecol. 84,7, 1977

185 Wu, B., Kikkawa, Y., Orzalesi, M.M., Motoyama, E.K., Kaibara, M., Zigas, C.J., Cook, C.D.
The Effect of Thyroxine on the Maturation of Fetal Rabbit Lungs
Biolog. Neonate 22: 161-168, 1973

186 Yaffe, H., Bar-On, H., Eldar, A., Ron, M., Sadovsky, E.
Correlation between Thromboplastic Activity and Lecithin/Sphingomyelin Ratio in Amniotic Fluid - Preliminary Report
Brit. J. Obstet. Gynaecol. 84,5 1977

187 Young, S.L., Tierney, D.F. and Clements, J.A.
J. Appl. Physiol. 29, 780-785, 1970

Lebenslauf

- geb. am 4.11.1953 in Köln als 2. Kind der Eheleute Dr. Wilhelm Dolfen und seiner Frau Dorothea, geb. Klippel

- 1960 - 1964	Besuch der Katholischen Volksschule in Knapsack
- 1964 - 1972	Besuch der Hildegard-von-Bingen Schule in Köln (Humanistischer Zweig)
- WS 1972/73	Beginn des Studiums der Humanmedizin in Köln
- Aug. 1974	Ärztliche Vorprüfung
- Aug. 1975	erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Aug. 1975 - Aug. 1976	Studium der Humanmedizin in Birmingham (Großbritannien)
- WS 1976/77	Fortsetzung des Studiums in Bonn
- März 1978	zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- April 1978 - März 1979	Praktisches Jahr in der Universitätsklinik Bonn a) Medizinische Poliklinik b) Gynäkologische und geburtshilfliche Klinik c) Chirurgische Klinik (davon einen Teil in der Kinderorthopädischen Klinik)
- April/Mai 1979	dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 15. Mai 1979	Beginn der pädiatrischen Facharztausbildung im Kinderkrankenhaus in der Amsterdamerstraße